



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

João Pedro Sanchez Almeida

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular: uma revisão sistemática da literatura.” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Maria de Fátima Ferreira e da Professora Doutora Sónia Alexandra Silva Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

João Pedro Sanchez Almeida

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular: uma revisão sistemática da literatura.” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Maria de Fátima Ferreira e da Professora Doutora Sónia Alexandra Silva Santos apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eu, João Pedro Sanchez Almeida, estudante do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014207959, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular: uma revisão sistemática da literatura.” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de setembro de 2019.

A handwritten signature in blue ink that reads "João Almeida". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

(João Pedro Sanchez Almeida)

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmão,

Pelo apoio permanente em qualquer fase da minha vida. Olho para vós e vejo os mais importantes pilares que me sustentaram até aos dias de hoje e me transmitiram valores fulcrais de trabalho, dedicação, persistência e resiliência que se demonstrarão fulcrais para o meu futuro enquanto profissional e enquanto pessoa. Um obrigado não fará, nunca, jus enquanto agradecimento por tudo aquilo que fizeram por mim.

À Graciela Gomes,

Por ser a pessoa mais importante que Coimbra me apresentou. O teu apoio incondicional, carinho e compreensão nas diversas situações em que passámos juntos foram, em grande parte, a chave do meu sucesso enquanto estudante. Torna-se impossível transmitir por palavras toda a gratidão que nutro por ti, restando agradecer-te, uma vez mais, por toda a ajuda e por me acompanhares em todos os momentos.

Aos amigos de Avanca,

Pelo apoio constante; pela compreensão, quando não pude estar presente; pela forte amizade; e pelas grandes memórias passadas que embelezam a minha vida e tornam-me uma pessoa mais completa.

Às amigadas que Coimbra me trouxe,

Pelos bons momentos passados e por me ajudarem a viver o espírito académico e a tradição coimbrã de forma plena.

À Professora Doutora Sónia Santos,

Um especial agradecimento pela orientação, ajuda, compreensão e disponibilidade nesta fase final do meu percurso académico.

À Dra. Vânia Lopes,

Pela constante disponibilidade em transmitir conselhos e pela incansável ajuda.

A toda a equipa da Farmácia Lopes Rodrigues,

Por me terem recebido da melhor forma possível e pelos ensinamentos transmitidos em ambiente de farmácia comunitária.

A toda a equipa da farmácia hospitalar em Zagreb, Croácia,

Pela perfeita integração na farmácia da *klinička bolnica dubrava* e por me ajudarem a conhecer e viver Croácia em plenitude.

A Coimbra,

*“De Coimbra, fica o sonho e fica a graça*

*Antero de revolta, capa à solta*

*De Coimbra, fica um tempo que não passa*

*Neste passar de um tempo que não volta.”*

Manuel Alegre

*“If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants”*

Isaac Newton

# Índice

## PARTE I - Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária Farmácia Lopes Rodrigues

Índice de Figuras	7
Lista de Abreviaturas	10
1. Introdução	11
1.1. Farmácia Lopes Rodrigues	12
2. ANÁLISE SWOT	13
2.1. Pontos Fortes	14
2.1.1. Capacidade de discurso com o utente	14
2.1.2. Serviços Farmacêuticos	14
2.1.3. Plano de estágio bem organizado	15
2.1.4. Único estagiário	16
2.1.5. Horário de atendimento variado	16
2.1.6. Organização e disciplina	17
2.2. Pontos Fracos	17
2.2.1. Aplicação de planos de participação	17
2.2.2. Receitas manuais	18
2.2.3. Aconselhamento de produtos e medicamentos para uso oftálmico e otológico	19
2.2.4. Influência do estatuto de estagiário	19
2.2.5. Associação DCI e nome comercial	19
2.3. Oportunidades	20
2.3.1. Ações Formativas	20
2.3.2. Capacidade de adaptação às alterações de atendimento	21
2.4. Ameaças	21
2.4.1. Preparação de Manipulados	21
2.4.2. MNSRM em grandes superfícies e parafarmácias	22
2.4.3. Conhecimento do utente e mentalidade social	23
3. Casos clínicos	23
3.1. Caso clínico 1.	23
3.2. Caso clínico 2.	24
3.3. Caso clínico 3.	24
4. Conclusão	26
5. Referências Bibliográficas	27

## PARTE II - Monografia

### Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular: uma revisão sistemática da literatura

Lista de abreviaturas	29
Resumo	31
Abstract	32
1. Introdução	33
2. Vasculogénese e Angiogénese	33
3. Marcadores antigénicos	34
3.1. Origem das células progenitoras endoteliais	34
3.2. Marcadores	35
3.3. Definição das células progenitoras endoteliais: Limitações	37
4. Identificação e Caracterização das células progenitoras endoteliais	38
4.1. Métodos	38
4.1.1. Citometria de Fluxo	38
4.1.2. Cultura Celular	39
4.1.3. Limitações aos métodos	40
5. Etapas de Mobilização, Migração e Incorporação	41
5.1. Mobilização	42
5.2. Migração	42
5.3. Incorporação	42
6. Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular	43
6.1. Fatores de risco modificáveis	44
6.1.1. Células progenitoras endoteliais e consumo de tabaco/tabagismo	44
6.1.2. Células progenitoras endoteliais e o exercício físico	46
6.1.3. Células progenitoras endoteliais e o peso corporal	49
6.2. Fatores de risco não modificáveis	53
6.2.1. Células progenitoras endoteliais e a idade	53
6.2.2. Células progenitoras endoteliais e o género	56
7. Conclusão	59
8. Referências Bibliográficas	62

## Índice de Figuras

Figura 1 - Formação de vasos sanguíneos através do agrupamento de precursores endoteliais (angioblastos) numa rede vascular primitiva (vasculogénese) que se expande e se remodela (angiogénese). Adaptado de CARMELIET [9]. \_\_\_\_\_ 34

Figura 2 - Mobilização de CPEs da medula óssea até à incorporação no endotélio vascular. Na medula óssea, as CPEs precoces expressam os marcadores CD133, CD34, KDR e quando atingem o estadió de maturação expressam CD34, KDR e vWF, perdendo, naturalmente, o marcador de imaturidade CD133. Adaptado de HRISTOV *et al.* [35]. \_\_\_\_\_ 36

Figura 3 - Ensaíos de cultura celular para células progenitoras endoteliais. A figura esquematiza os diferentes ensaios de cultura celular descritos na literatura para as CPEs, nomeadamente CPEs precoces, CPE-CFUs e CPE tardias. acLDL: *low density lipoprotein* acetilada; CD: *cluster of differentiation*; CPEs: células progenitoras endoteliais; CPE-CFUs: células progenitoras endoteliais-*colony forming units* (unidades formadoras de colónias); KDR: *kinase inser domain receptor*; MNCs: células mononucleares; vWF: fator *von Willebrand*. Adaptado de LEAL *et al.* [36]. \_\_\_\_\_ 40

Figura 4 - As três fases ao longo do percurso efetuado pelas CPEs desde a medula óssea até ao endotélio vascular. Adaptado de ROSENZWEIG [52]. \_\_\_\_\_ 41

Figura 5 - As CPEs apresentam um papel importante na reparação vascular. Uma subpopulação deste tipo de células poderá sofrer incorporação na monocamada endotelial e transdiferenciar-se em células musculares lisas. Adaptado de HRISTOV *et al.* [35]. \_\_\_\_\_ 43

Figura 6 - Variação de CPEs CD34+KDR+ ao longo do tempo após teste de esforço em indivíduos com ICC, comparando com indivíduos jovens e adultos saudáveis. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. da variação em percentagem relativa ao valor basal. \*  $p < 0,05$ , I; \*\*  $p < 0,05$ , vs. valor basal. Adaptado de VAN CRAENENBROECK *et al.* [82]. 48

Figura 7 - Comparação do número de CPEs entre grupo de obesos e grupo de não obesos (controlo). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 100 e 29 indivíduos por grupo, respetivamente. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de Student. \*  $p < 0,01$  vs grupo não-obeso. Adaptado de PIRES *et al.* [93]. \_\_\_\_\_ 50

Figura 8 - Correlação entre IMC e o número de CPs. Adaptado de MULLER-EHMSEN *et al.* [99]. \_\_\_\_\_ 53

Figura 9 - Comparação do número de CPEs CD34+KDR+ em diferentes grupos etários. O número de CPEs é três vezes superior em crianças comparativamente à idade adulta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.D.  $72 \pm 60$  vs.  $22 \pm 22$  células CD34+KDR+ por 100.000 granulócitos,  $p < 0,0001$ . Adaptado de JIE *et al.* [107]. \_\_\_\_\_ 54

Figura 10 - Comparação do número de CPEs considerando género e perfil colesterolémico. O número de CPEs diminui em ambos os géneros em indivíduos hipercolesterolémicos. C-LDL: colesterol LDL. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. \*\*\* ( $p < 0,0001$ ) vs. grupo controlo. Adaptado de ROSSI *et al.* [112]. \_\_\_\_\_ 57

Figura 11 - Variação do número de CPEs, para ambos os géneros, desde recém-nascido até sénior (idoso). F: Género feminino; M: Género masculino. \*  $p < 0,05$  homem vs. mulher. Adaptado de FADINI *et al.* [113]. \_\_\_\_\_ 58

# PARTE I

## Relatório de estágio de Farmácia Comunitária

Farmácia Lopes Rodrigues



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

## Lista de Abreviaturas

<b>AIM</b>	Autorização de Introdução no Mercado
<b>DCI</b>	Denominação Comum Internacional
<b>DIM</b>	Delegado de Informação Médica
<b>FFUC</b>	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
<b>iECA</b>	Inibidor da Enzima de Conversão da Angiotensina
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>MICF</b>	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
<b>MNSRM</b>	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
<b>MSRM</b>	Medicamento Sujeito a Receita Médica
<b>PUV</b>	Produto de Uso Veterinário
<b>PVP</b>	Preço de Venda ao Público
<b>SNS</b>	Sistema Nacional de Saúde
<b>SWOT</b>	<i>Strenghts, Weekness, Oportunities, Threats</i>

## I. Introdução

A farmácia comunitária é, nos dias de hoje, um pilar na saúde pública, apoiando-se de forma crucial no Serviço Nacional de Saúde (SNS). Face às inúmeras necessidades no âmbito da saúde e bem-estar manifestadas pela comunidade, torna-se emergente uma ajuda eficiente no contexto farmacoterapêutico. Desta forma, a farmácia é tida, muitas vezes, como a primeira linha de acesso a cuidados de saúde por parte da população. Tal facto torna ainda mais prestigioso e notável a profissão do farmacêutico. No entanto, acresce, igualmente, maior sentido de responsabilidade de forma a promover o melhor serviço que faça jus à situação que é apresentada.

Cada vez mais torna-se imperativo a presença de um complexo espólio de ferramentas de trabalho em ambiente de farmácia comunitária. A oferta de serviços vai crescendo em forte oposição às forças externas concorrentes por serviços similares, exigindo frequentes adaptações de conhecimento científico por parte dos farmacêuticos e técnicos auxiliares de farmácia.

É facilmente perceptível que a pressão económica que se abateu sobre o território nacional, enfraquecendo diversas unidades pelo país, forçou o conhecimento nas áreas de gestão e economia de forma a poder aumentar rendimentos outrora passíveis de serem economicamente desnecessários. Na minha perspetiva, este fator revela-se determinante e exemplificativo de como deve ser a postura de um futuro profissional de saúde: autónomo, proativo, adaptativo e resiliente.

Ser farmacêutico em farmácia comunitária é uma profissão complexa que dispõe, por um lado, de uma vertente teórica extensa, e, por outro, de uma capacidade prática intensiva e exigente. É, portanto, neste sentido de aprendizagem que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) permite a realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária, concedendo ao estudante um contacto mais próximo da realidade de trabalho.

O estágio decorreu na Farmácia Lopes Rodrigues, sediada na freguesia de Válega, Ovar, sob a orientação da proprietária e Diretora Técnica Dra. Maria de Fátima Ferreira, que tentou ao longo do estágio fomentar conhecimentos na área de farmácia comunitária e consolidar conceitos lecionados ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

Realizo este relatório em formato de análise SWOT (*Strengths, Weakness, Opportunities, Threats*) onde irei segmentar numa alçada interna aspetos cruciais do meu estágio, nomeadamente os Pontos Fortes (*Strengths*) e Pontos Fracos (*Weakness*) e, por um ponto de vista externo, as Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*).

Por último, exponho 3 casos clínicos ocorridos ao longo do meu estágio que, para além da oportunidade de aprendizagem, creio serem objeto de alguma reflexão interna.

### I.1. Farmácia Lopes Rodrigues

A farmácia Lopes Rodrigues está localizada em Válega, Ovar, e caracteriza-se por uma farmácia de dimensões médias, com espaço complementado por um *design* moderno e ajustado aos dias de hoje. Trabalha com recurso a armário com gavetas de disposição de medicamentos próximo do local de atendimento e possui três balcões de atendimento.

A farmácia Lopes Rodrigues toma como pilar principal no seu trabalho diário a boa relação com os utentes, fomentando a cooperação, compreensão e prioriza a atenção do utente.

Fazem parte do corpo profissional da farmácia:

- Dra. Maria de Fátima Ferreira – Proprietária e Diretora Técnica;
- Dra. Carla Oliveira – Farmacêutica Adjunta Substituta;
- Sra. Anabela Silva – Técnica Auxiliar de Farmácia;
- Sra. Dulcina Matos – Técnica Auxiliar de Farmácia;
- Dr. Ricardo – Gestor Contabilístico.

## 2. ANÁLISE SWOT



## 2.1. Pontos Fortes

### 2.1.1. *Capacidade de discurso com o utente*

Para que se possa prestar um serviço eficiente, claro e completo, a comunicação é uma ferramenta fundamental no dia-a-dia do farmacêutico comunitário. Os idosos são uma das classes etárias que mais requer atenção na hora do atendimento pois carecem, muitas vezes, de capacidade cognitiva que lhes permitam perceber, questionar e aceitar determinadas circunstâncias.

Ao longo do MICEF, as apresentações orais realizadas nas diversas unidades curriculares demonstraram-se substanciais para alicerçar a componente de comunicação que, a meu ver, torna-se crucial aquando das situações descritas acima.

Deste modo, são claramente indispensáveis ferramentas de discurso que permitam uma clara explicação ao utente sobre aspetos técnicos associados a componentes farmacológicas e fisiopatológicas, assim como expressar compreensão e empatia por cada situação que nos é apresentada.

### 2.1.2. *Serviços Farmacêuticos*

Antes de uma determinada patologia estabelecida, deverá ser prioritário a atividade preventiva por parte dos utentes. Desse modo, a farmácia tem ao seu dispor diferentes tipos de serviços, nomeadamente:

- Aconselhamento farmacoterapêutico e não farmacológico;
- Medição de parâmetros bioquímicos:
  - Glicémia;
  - Colesterol total;
  - Pressão arterial e frequência cardíaca;
  - Índice de Massa Corporal (IMC).
- Consulta de Nutrição e Dietética;
- Rastreio de Audiologia;
- Troca de Seringas.

Ao longo do estágio, este tipo de serviços farmacêuticos permitiu-me executar e aprimorar técnicas de rastreio de doenças cardiovascular e de origem metabólica, assim como

participar em aconselhamentos farmacoterapêuticos e direcionar, quando necessário, o utente para o seu médico de família.

Na minha perspetiva, trata-se de um serviço preventivo de extrema importância pois permite fomentar a relação farmacêutico-utente, consolidando, dessa forma, a confiança pelo serviço farmacêutico e, ao mesmo tempo, caracteriza-se por uma ferramenta auxiliar na deteção precoce de determinada patologia de origem metabólica ou cardiovascular.

### 2.1.3. *Plano de estágio bem organizado*

A integração numa equipa de trabalho é um processo moroso e que requer esforços de ambas as partes. A minha integração foi progressiva, auxiliada por um plano de estágio, elaborado pela Diretora Técnica e Farmacêutica Adjunta Substituta, respetivamente, Dra. Maria de Fátima Ferreira e Dra. Carla Oliveira, onde foram estipuladas atividades a serem cumpridas ao longo do período de estágio.

Este “calendário” de estágio permitiu uma eficiente aprendizagem, mas também uma adaptação gradual ao estilo de trabalho diário exercido por todo o corpo profissional. Pude, desta forma, experienciar o vasto conjunto de funções existentes numa farmácia comunitária, nomeadamente:

- Receção de encomendas;
- Aprovisionamento de medicamentos e produtos de venda livre;
- Execução de rastreios;
- Revisão do receituário;
- Realização de encomendas;
- Atendimento ao balcão;
- Entre outras.

Considero ter sido um plano bem organizado e ajustado às competências de um estagiário, tendo existido sempre disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e melhorias de desempenho. Tal facto permitiu com que me sentisse confortável, seguro e motivado para aprender novas funções e desempenhar uma boa *performance* na farmácia.

#### 2.1.4. *Único estagiário*

O facto de ter sido, durante sensivelmente 4 meses, o único estagiário na farmácia, permitiu que toda a equipa pudesse depositar alento e atenção ao longo do meu estágio. Desta forma, senti-me confortável para, em qualquer momento, solicitar ajuda a qualquer membro da equipa. Por outro lado, este fator permitiu realizar este estágio de forma metódica, progressiva, sem necessidade de ultrapassar etapas por falta de tempo.

De uma forma geral, considero este ponto forte tanto para a farmácia, por despender menos recursos no processo de aprendizagem do estagiário mas, ainda mais importante para o estudante, que se vê em posição favorável em auferir o máximo de faculdades que a farmácia comunitária exige.

#### 2.1.5. *Horário de atendimento variado*

A Farmácia Lopes Rodrigues apresenta horário de serviço alternado semanalmente com outra farmácia da vila de Válega, pelo que, quando em serviço, a farmácia Lopes Rodrigues abre portas das 9h até às 20h em dias úteis, feriados e fins-de-semana. Deste modo, pude observar, presenciar e realizar atendimentos de origem diversa. Assim, de forma breve, constatei que durante a semana, o perfil de utentes é diferente do tipo de utente que procura a farmácia quer a um feriado, quer ao fim-de-semana. Em dias úteis, a maioria dos utentes visitam a farmácia frequentemente, apresentando uma relação de confiança consolidada com a farmácia, pelo que há, na maioria das situações, maior capacidade de compreensão e facilidade de comunicação. No entanto, em certos casos, o atendimento carece de comportamento ativo pelo farmacêutico relativamente a aspetos farmacoterapêuticos pois a medicação é habitual e grande parte dos utentes sabe que medicamentos toma; quais as indicações terapêuticas e respetiva posologia.

Por outro lado, os utentes que recorrem à farmácia durante feriados ou fins-de-semana caracterizam-se por serem, na maioria, utentes não fidelizados, não conterrâneos e que procuram tirar dúvidas sobre alguma questão mais específica, ou que intencionam ajuda farmacêutica para situações ocasionais de gravidade leve a moderada.

A possibilidade de estagiar em diferentes dias da semana permitiu-me tirar ilações valiosas sobre o comportamento do farmacêutico a ter nestes diferentes atendimentos, enriquecendo, dessa forma, a minha experiência em ambiente de farmácia comunitária.

### 2.1.6. *Organização e disciplina*

A Farmácia Lopes Rodrigues prima pelo sentido de organização, disciplina e determinação no seu dia-a-dia de trabalho. Remonto ao primeiro dia de estágio onde me foi explicada a política *kaizen*. Trata-se de uma estratégia a ser incorporada tanto em empresas, como a nível pessoal, que visa a melhoria contínua. A introdução de medidas como reuniões diárias, onde se aborda a *performance* de cada elemento de equipa; correções de melhoria e metas a alcançar diariamente, ou a normalização da farmácia seja no local de atendimento e *back office*, demonstram-se substancialmente positivas para alguém que necessite de uma rápida adaptação, como é o caso de um estagiário. Deste modo, pude realizar as tarefas de forma sistemática e, posteriormente, de forma autónoma com relativa facilidade e constante motivação para aperfeiçoamento a cada dia de estágio.

## 2.2. Pontos Fracos

### 2.2.1. *Aplicação de planos de participação*

No momento da dispensa de um medicamento sujeito a receita médica (MSRM), o utente faz-se acompanhar de receita médica onde consta a prescrição feita pelo médico. Uma percentagem significativa dos MSRM são comparticipados pelo estado português, permitindo um custo de compra menor para o utente. Em certas situações, essa comparticipação é feita na totalidade, como são, por exemplo, os produtos de ostomia e certos medicamentos para a diabetes *mellitus*. No entanto, para além da comparticipação do estado português, há ainda uma quota parte do preço de venda ao público (PVP) que pode ser paga por outras entidades, permitindo um custo final ainda mais reduzido para o utente. Estas situações carecem de ação de subsistemas de saúde que são exclusivas para determinados grupos de utentes, como por exemplo, Sindicato dos Bancários, SAVIDA, Assistência na Doença aos Militares, Caixa Geral de Depósitos, Médis, entre outros [1].

Numa situação regular, o utente, para além da receita médica, faz-se acompanhar de documento comprovativo, normalmente um cartão, onde demonstra ter direito a comparticipação por parte de um subsistema de saúde acima referido. A aplicação deste tipo de planos exige atenção por parte do operador de modo a não prejudicar o utente nem a instituição, neste caso, a farmácia, aplicando, por exemplo, um plano de comparticipação errado. Não obstante, enfatizo também situações particulares onde o utente se esquece ou não apresenta

o cartão identificativo do subsistema, culminando numa situação constrangedora para o operador pois, na maioria das vezes, é requerida a anulação de venda, sendo necessário repetir todo o processo de dispensa do medicamento. Este tipo de situações, naturalmente, promovem um ambiente desconfortável propício a conflito farmacêutico-utente.

Apesar de ter estado poucas vezes neste contexto em particular, classifico-o como um ponto fraco pela dificuldade que senti em certos casos de aplicação de planos de comparticipação.

### 2.2.2. *Receitas manuais*

Ainda no âmbito do atendimento, refiro como ponto fraco as receitas manuais. Aquando da dispensa de um medicamento prescrito via receita médica, esta poderá ser eletrónica ou manual. O processo de dispensa feito por receita eletrónica, seja materializada ou não materializada, é fluído, intuitivo e seguro. Na dispensa de medicamentos por receita manual, esta poderá representar, muitas vezes, um processo complicado, complexo e moroso. Tal deve-se a diferentes fatores, nomeadamente:

- Prescrição ilegível;
- Inexistência de dados exigidos para que se realize a comparticipação, enumerando:
  - Nome do beneficiário;
  - N° de beneficiário;
  - Entidade responsável;
  - Exceção legal assinalada;
  - Vinheta do médico;
  - Vinheta do local de prescrição (se aplicável);
  - Data de validade e Assinatura do médico;
  - Inexistência de Despacho ou Portaria que confere regime especial de comparticipação (Ex: Desp. 13020/2011 – Alzheimer) [2].

Na minha opinião, trata-se de um processo muito rigoroso, de elevada importância que exige extrema atenção por parte de quem realiza o atendimento. Naturalmente, apresentei dificuldades neste tipo de situações, necessitando da ajuda dos restantes profissionais presentes na farmácia.

### 2.2.3. *Aconselhamento de produtos e medicamentos para uso oftálmico e otológico*

Como dito anteriormente, o utente procura, em primeiro lugar, a farmácia comunitária para determinadas situações de saúde com vista a uma solução eficaz e rápida. Deparei-me com algumas situações específicas onde os utentes necessitavam de auxílio para problemas oftálmicos e otológicos de reduzida gravidade/emergência. Dada a inexperiência teórica e prática na resolução de casos clínicos inseridos no seio da oftalmologia e otorrinolaringologia (otologia), encontrei-me com dificuldades em saber o que aconselhar e dispensar. Desta forma, pautei-me pelo bom senso e honestidade em pedir a colaboração e ajuda aos restantes membros da equipa, que tinham mais experiência neste tipo de casos, permitindo um processo de atendimento seguro e benéfico para o utente.

### 2.2.4. *Influência do estatuto de estagiário*

No seio de uma comunidade pequena/média como é o caso da vila de Válega, onde realizei o meu estágio, o público *major* caracteriza-se por utentes frequentes da farmácia, na sua maioria idosos (>65 anos), onde obtêm a sua medicação habitual. Esta frequência é extremamente positiva para a farmácia pois é resultado de um processo eficaz de fidelização, mas, ao mesmo tempo, permite uma adaptação, por vezes, complicada aquando da inserção de um elemento novo na equipa profissional.

Como estagiário, encontrei-me em diversos atendimentos onde o utente, após o meu aconselhamento, encontrava-se pouco recetivo, desconfiado e cético, tendo, muitas vezes, de recorrer à palavra de um profissional da equipa de farmácia.

Apesar de achar completamente natural e expectável este tipo de comportamento por parte dos utentes, eram, por vezes, situações de algum *stress* e desconforto, que requeriam compreensão e alguma capacidade de comunicação de modo a evitar possíveis conflitos com os mesmos.

### 2.2.5. *Associação DCI e nome comercial*

Antes da introdução do complexo mercado dos genéricos, a dispensa de qualquer medicamento numa farmácia era realizada, maioritariamente, recorrendo ao nome comercial. Este processo de dispensa manteve-se até à introdução dos medicamentos genéricos.

Durante o meu estágio, pude observar dois aspetos relevantes sobre este tópico, nomeadamente:

- I. Relativa persistência por parte do utente a utilizar nome comercial. Constatei que determinados utentes ainda se referem aos medicamentos unicamente pelo seu nome comercial, não desejando obter medicamento genérico;
- II. Dificuldade pessoal na associação DCI e nome comercial.

Relativamente ao ponto II., assumo ter tido dificuldades nesta associação, principalmente em contexto de atendimento com utentes que só recorrem ao nome comercial. Entendo perfeitamente que esta dificuldade seja normal e expectável, pois ao longo do meu percurso no MICF foram feitas reduzidas referências aos nomes comerciais. Não obstante, em ambiente de farmácia comunitária, este fator demonstrou-se preponderante, tendo sido necessário recorrer à ajuda dos restantes profissionais de modo a conseguir ultrapassar esta adversidade.

## 2.3. Oportunidades

### 2.3.1. *Ações Formativas*

Exercer farmácia comunitária, local caracterizado pelo seu extenso conjunto de produtos em venda, MSRM, medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), dispositivos médicos, produtos de bem-estar, cosmética, puericultura e produtos de uso veterinário (PUV), carece de uma constante atualização sobre medicamentos e/ou produtos que tenham alterações de posologia ou novas indicações terapêuticas, assim como a introdução de novos produtos/medicamentos no mercado. Como tal, são realizadas formações, por entidades devidamente certificadas, com o âmbito de divulgar dados científicos relevantes de forma a que os farmacêuticos possam tomar uma posição mais clara, confortável e segura sobre determinado medicamento/produto.

Apesar de não ter assistido a qualquer formação durante o meu estágio, considero-as de extrema importância e preponderantes para que qualquer farmácia tenha um atendimento seguro, eficaz e benéfico para o utente.

Na impossibilidade de assistir a uma formação, faço referência ainda, com alguma relevância, às atividades realizadas pelos delegados de informação médica (DIM). Acredito que o papel dos DIM seja de elevada importância, sendo crítica uma boa relação farmacêutico-DIM.

Julgo haver uma oportunidade neste contexto pois está patente que a divulgação de informação científica sobre determinado medicamento é uma mais-valia para o farmacêutico e permite que o mesmo consiga acompanhar, de forma eficiente, possíveis alterações aos termos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e o surgimento de novas AIM's.

### 2.3.2. *Capacidade de adaptação às alterações de atendimento*

O *Sifarma2000*<sup>®</sup> é uma ferramenta fundamental para o trabalho diário do farmacêutico. Ao longo do tempo, esta ferramenta foi sofrendo atualizações para colmatar as necessidades que são exigidas durante o atendimento. O novo módulo de atendimento do *Sifarma2000*<sup>®</sup> é uma recente atualização, ainda em projeto piloto em algumas farmácias, que procura facilitar e tornar ainda mais intuitivo todo o processo de dispensa de medicamentos e/ou produtos.

Apesar de não ter experienciado, ao longo do meu estágio, este novo módulo, acredito tratar-se de uma oportunidade de enaltecer a atividade do farmacêutico por permitir maior qualidade no tempo de aconselhamento farmacêutico, comparativamente ao módulo antigo/ainda atual.

## 2.4. Ameaças

### 2.4.1. *Preparação de Manipulados*

A Farmácia Lopes Rodrigues não dispõe, no presente, de serviço de preparação de manipulados. Este serviço reveste-se de elevada importância em situações de ajuste de dose para determinadas patologias ou tratamentos individualizados, assim como na população pediátrica. Nos dias de hoje, a Farmácia Lopes Rodrigues não inclui este serviço fruto da diminuição da necessidade do mesmo pela evolução tecnológica e industrial em alcançar formulações cada vez mais ajustadas à diversidade clínica de cada doente. Não obstante, observei o reencaminhamento por parte da farmácia a outras farmácias possuidoras deste serviço, em contexto de parceria, de modo a salvaguardar as necessidades do utente. Identifico esta matéria como uma ameaça no sentido em que, relativamente a esta questão, não pude consolidar práticas fundamentais da farmácia galénica aprendidas ao longo do MICF, carecendo neste aspecto no futuro profissional.

#### 2.4.2. *MNSRM em grandes superfícies e parafarmácias*

Segundo o Decreto-Lei n.º 134/2005, a dispensa de MNSRM é permitida fora das farmácias portuguesas, nomeadamente em grandes superfícies comerciais e parafarmácias. Apesar destes locais serem objeto de registo prévio, e consequentes fiscalizações, junto do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, INFARMED, a dispensa de MNSRM e seu aconselhamento, muitas vezes, carecem de uma abordagem correta e de informação relevante para o utente [3]. Este facto pode ser resultado tanto de uma insuficiente formação por parte de alguns profissionais habilitados a trabalhar nestes locais, assim como o próprio ambiente onde é feita a dispensa. Grandes superfícies comerciais de consumo inferem um sentido de compra por impulso e prazer que, por vezes, estende-se à compra de MNSRM, o qual não deveria ser permitido pelos efeitos adversos que possam ser passíveis de ocorrer nos utentes por incorreta obtenção de MNSRM.

Ao longo do meu estágio pude, em determinados casos, constatar a falta de informação científica, fruto de automedicação, no que diz respeito à correta utilização ou indicação terapêutica de determinado MNSRM/produto por utentes que tinham adquirido o mesmo em locais como parafarmácias ou grandes superfícies comerciais. De igual modo, observei relutância por parte do utente no momento de dispensa pelo facto do PVP ser superior ao PVP exercido em locais fora de farmácias. Este tipo de situações geram algum conflito e exigem capacidade de comunicação em demonstrar que a obtenção deste tipo de produtos não deverá ser feita exclusivamente por requisito de preço, mas sim, tendo em consideração o risco-benefício para a saúde individual de cada utente.

Classifico esta conjuntura como uma ameaça na medida em que verifiquei que o papel do farmacêutico fica, por vezes, associado a esta falta de informação. O utente não faz distinção entre um profissional de farmácia e um profissional de venda de MNSRM fora de farmácias, julgando tratar-se de profissionais com as mesmas habilitações.

Com esta observação não é meu objetivo generalizar a classe profissional de venda de MNSRM fora de farmácias, pois a classe farmacêutica apresenta, igualmente, lacunas a preencher e aspetos a aperfeiçoar. No entanto, friso a necessidade dos jovens farmacêuticos em procurar estabelecer relações fortes com a comunidade, fazendo apelo ao benefício de um aconselhamento farmacêutico, mesmo que justifique acréscimo económico para o utente.

### 2.4.3. *Conhecimento do utente e mentalidade social*

Faço referência a outro aspeto importante que, na minha opinião, tem sido cada vez mais frequente nas farmácias portuguesas: conhecimento prévio do utente.

Pela inserção das novas tecnologias na sociedade, como é o caso da *internet*, a comunidade tem acesso fácil e rápido à informação. Em muitos casos, os dados obtidos beneficiam estas pessoas, tornando-as mais informadas sobre determinado assunto. No entanto, em situações que dizem respeito à saúde e bem-estar a informação obtida é, na maioria das vezes, incorreta e sem fundamento científico.

De uma forma geral, o público associado a este contexto é jovem, possuidor de meios que facilitam o acesso a este tipo de informação eletrónica. Apesar de ter experienciado poucas vezes este tipo de comportamento perante o bem-estar próprio do utente, constatei que estas situações culminam em atendimentos difíceis pois o utente não demonstra cooperação no aconselhamento farmacêutico, mantendo a sua posição face a determinada questão de saúde.

Classifico-o, assim, como uma forte ameaça pois as próximas gerações, muito provavelmente, farão uso destas tecnologias promovendo maior frequência deste tipo de circunstâncias no futuro.

## 3. Casos clínicos

### 3.1. Caso clínico I.

Uma senhora deslocou-se à farmácia para poder dispensar um MSRM, por meio de uma prescrição médica. O medicamento em questão foi o Topamax<sup>®</sup> em dosagem de 50mg. A posologia referia uma toma inicial de 50mg e posteriormente reduzir para metade, 25mg, por fracionamento do comprimido de 50mg. O medicamento em questão, revestido por película, não deve ser fracionado [4]. A conservação do Topamax<sup>®</sup> 50mg é em blister alumínio/alumínio para proteção contra a humidade e luz [4]. Perante a situação, tentei informar-me com a equipa da farmácia, expondo a circunstância, ao que percebemos que poderia haver comprometimento farmacocinético e farmacodinâmico, com possível inefetividade terapêutica devido ao fracionamento dos comprimidos. Aliado a este fator, o Topamax<sup>®</sup> existe em dosagem de 25mg, pelo que, se houvesse prescrição para ambos os medicamentos, o utente não correria

risco de uma terapêutica inefetiva. Considero pertinente este tipo de situações onde julgo haver um papel fulcral do farmacêutico em expor estes casos ao médico, solicitando a avaliação da efetividade e otimização da toma do medicamento nos moldes propostos.

### 3.2. Caso clínico 2.

Um senhor veio à farmácia solicitar serviço de medição de parâmetros bioquímicos. Apresentava-se em jejum e tinha como finalidade a medição da glicémia, colesterol total e pressão arterial. Ao longo da medição dos parâmetros, fui abordando o utente no sentido de tomar conhecimento do seu estado clínico; possíveis doenças cardiovasculares; eventos cardiovasculares e histórico de antecedentes familiares. Ao mesmo tempo, fui tomando atenção a uma tosse persistente que o senhor tinha desde o momento que entrou na farmácia. O *feedback* estava a ser fluído e objetivo até que lhe questionei sobre se se tinha constipado recentemente, ao que me negou esse facto. Questionei, então, sobre possíveis alergias de forma a tentar perceber se essa tosse seria algo normal, tendo em conta a estação do ano (primavera), ao que, igualmente, me foi negada essa associação. Em última estância, perguntei se tinha iniciado recentemente medicação para hipertensão arterial, tendo a resposta sido afirmativa. Posteriormente, procurei saber qual o princípio ativo e tomei conhecimento de ser um inibidor da enzima de conversão da angiotensina (iECA), fármaco de primeira linha após diagnóstico de hipertensão arterial, que apresenta como um dos efeitos adversos mais frequentes: tosse seca e irritativa [5]. Como tal, questionei se durante a noite também tinha tosse seca e irritativa, tendo o senhor confirmado que tinha muita tosse e, por esse motivo, tinha dificuldade em descansar. Perante o contexto apresentado, optei por não recomendar MNSRM ou produtos que auxiliem a indução e prolongamento do sono, explicando que, muito provavelmente, a solução, quer para a tosse seca e irritativa quer para a falta de descanso noturno, estaria na troca do iECA por outro medicamento para a hipertensão arterial, nomeadamente um bloqueador da entrada de cálcio ou um antagonista dos recetores da angiotensina II. Desse modo, alertei o utente para que tentasse ter uma consulta com o seu médico de família, expusesse os sintomas e referisse a medicação atual.

### 3.3. Caso clínico 3.

Um senhor recorre à farmácia com o intuito de comprar Imodium rapid®. No atendimento, o senhor não referiu quer sintomas ou sinais, unicamente que pretendia a compra do medicamento. Suspeitando que o medicamento fosse para o senhor, questionei se se tinha

sentido indisposto nos últimos tempos e se presenciou diarreias ou vômitos. Perante as questões, o senhor explicou que tivera um aniversário recentemente e que desde então tinha tido diarreia frequente (4 defeções/dia). Não obstante, negou ter tido vômitos durante este período. Expliquei que possivelmente se tratava de uma virose, fruto de algum alimento contaminado na festa de aniversário, e que a toma de Imodium rapid<sup>®</sup>, nesta situação em particular, iria fomentar o agravamento dos sintomas. Algo surpreendido com a explicação, o senhor fez referência às publicidades da Imodium<sup>®</sup> e que, por conseguinte, queria comprar o medicamento para que os sintomas cessassem o mais breve possível. Posto o contexto apresentado, abordei a situação explicando que o mais sensato e correto a fazer seria manter uma boa hidratação, de forma a compensar os líquidos perdidos e iniciar a toma de UL-250<sup>®</sup>, probiótico contendo *Saccharomyces boulardii*, com vista a regularização da flora intestinal. Por último, referi ainda que deveria continuar a permitir o normal funcionamento do intestino, fazendo referência ao mecanismo de eliminação deste tipo de patogéneos.

#### 4. Conclusão

O estágio em farmácia comunitária apresentou-se como um exercício intenso, rigoroso e bastante desafiante. Nos dias atuais, a atividade farmacêutica inserida numa comunidade exige múltiplas capacidades de forma a cumprir as necessidades de cada utente.

Pela complexidade desta atividade, acredito que este estágio me auxiliou na conquista de ferramentas de comunicação, pro-atividade e desempenho, que julgo serem indispensáveis na minha prática futura.

Através da constante orientação da Dra. Maria de Fátima Ferreira e restante equipa profissional, pude, por um lado, consolidar importantes conceitos teóricos e práticos e, por outro, tomar conhecimento do valor e prestígio que é exercer esta profissão. Esta experiência permitiu, igualmente, o imprescindível desenvolvimento da vertente pessoal como a compreensão e a sensibilidade na abordagem de situações mais críticas.

Em suma, acredito plenamente que o trabalho exercido de orientação e ensinamento foi realizado com sucesso, promovendo meios eficazes para aprendizagem, assim como uma excelente relação de amizade com todo o corpo profissional.

O saldo é, na minha mais sincera opinião, positivo, destacando com ênfase a disponibilidade, dedicação, empenho, paciência e persistência para que pudesse concretizar este estágio com o máximo de faculdades possíveis.

Agradeço substancialmente à equipa da Farmácia Lopes Rodrigues por me terem aceite neste processo formativo, assim como à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela oportunidade de realização deste estágio extremamente enriquecedor. Trata-se de um estágio fundamental não só para quem poderá enveredar por este ramo, mas também para aqueles que perspetivam outros domínios na área farmacêutica.

## 5. Referências Bibliográficas

1. INFARMED, I.P. - **Regimes excecionais de comparticipação**. [Acedido a 30 de junho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/regimes-excecionais-de-comparticipacao>
2. ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DO SISTEMA DE SAÚDE - **Manual de relacionamento das farmácias com o centro e conferência de faturas do sns**. 2015. [Acedido a 30 de junho de 2019]. Disponível na Internet: [https://www.ccf.min-saude.pt/portal/page/portal/estrutura/documentacaoPublica/ACSS/Manual%20de%20Relacionamento%20de%20Farmacias\\_v1.17.pdf](https://www.ccf.min-saude.pt/portal/page/portal/estrutura/documentacaoPublica/ACSS/Manual%20de%20Relacionamento%20de%20Farmacias_v1.17.pdf)
3. Decreto lei no 134/2005 de 16 de agosto do ministério da saúde, Diário da República, nº156, Série I de 16 de agosto de 2005, (4763-4765). [Acedido a 18 de Junho de 2019]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized>
4. INFARMED, I.P. - **Resumo das características do medicamento: Topamax 25mg, 50mg, 100mg e 200mg**. 01-12-2015. [Acedido a 18 de julho de 2019]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=8560&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8560&tipo_doc=rcm)
5. INFARMED, I.P. - **Resumo das características do medicamento: Coveram 5mg/5mg**. 28-09-2018. [Acedido a 17 de julho de 2019]. Disponível na Internet: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=44345&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=44345&tipo_doc=rcm)

## PARTE II

# Monografia: Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular: uma revisão sistemática da literatura



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

## Lista de abreviaturas

<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CPEs</b>	Células Progenitoras Endoteliais
<b>CFUs</b>	Unidades formadoras de colónias ( <i>Colony forming units</i> )
<b>CPE-CFUs</b>	Células Progenitoras Endoteliais – Unidades formadoras de colónias ( <i>Colony forming units</i> )
<b>CPs</b>	Células Progenitoras
<b>CXCR4</b>	Recetor de quimiocinas C-X-C tipo 4 ( <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> )
<b>DCV</b>	Doença Cardiovascular
<b>DMT I</b>	Diabetes <i>mellitus</i> tipo I
<b>EAM</b>	Enfarte Agudo do Miocárdio
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>EPCs</b>	<i>Endothelial Progenitor Cells</i>
<b>FITC-UEA-I</b>	<i>Flourescein isothiocyanat-Ulex europaeus-I</i>
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicada
<b>HDL</b>	<i>High-Density Lipoprotein</i>
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A redutase
<b>ICC</b>	Insuficiência Cardíaca Congestiva
<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>KDR</b>	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
<b>LDL</b>	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico ( <i>Nitric Oxide</i> )

<b>SDF-1</b>	Fator derivado das células do estroma ( <i>stromal cell-derived factor-1</i> )
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR2</b>	Recetor do fator de crescimento endotelial vascular 2 ( <i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i> )
<b>vWF</b>	Fator von Willebrand

## Resumo

As células progenitoras endoteliais (CPEs) são células originadas na medula óssea que exibem capacidade de diferenciação em células endoteliais maduras, promovendo a neovascularização em locais de isquemia e lesão vascular através do processo de vasculogênese pós-natal. Estas células desempenham um papel importante no contexto das doenças cardiovasculares (DCVs) e, por isso, têm sido objeto de investigação nas últimas duas décadas.

A obtenção de dados qualitativos e quantitativos sobre as CPEs é feita através de métodos como a citometria de fluxo e a cultura celular, sendo a citometria de fluxo o método preferencial. Para a caracterização e identificação destas células é necessária a seleção de um fenótipo bem definido e específico, tendo sido demonstrado que a combinação do *Cluster of Differentiation* (CD) CD34 e *kinase insert domain receptor* (KDR), nomeadamente, CD34+KDR+, é o fenótipo mais utilizado em contexto de doenças cardiovasculares. No entanto, não existe consenso sobre o fenótipo definitivo das CPEs.

Tendo em consideração a aplicabilidade deste tipo de células como biomarcadores de risco cardiovascular, o objetivo desta revisão monográfica assenta numa análise de fatores de risco modificáveis e não modificáveis, presentes na população em geral. Deste modo, pretende-se analisar criticamente o impacto do tabagismo, da atividade física, do peso corporal, da idade e do género no número e capacidade funcional das CPEs.

**Palavras-chave:** célula progenitora endotelial/CPE, risco cardiovascular, tabagismo, exercício físico, peso corporal, idade, género.

## Abstract

Endothelial progenitor cells (EPCs) are bone marrow-derived cells with the ability to differentiate into mature endothelial cells and promote neovascularization at sites of ischemia and vascular injury, through postnatal vasculogenesis. These cells play an important role in cardiovascular diseases and, consequently, have been a target of intensive research in the last two decades.

Qualitative and quantitative data on EPCs are obtained through methods such as flow cytometry and cell culture assays, with flow cytometry being the preferred method. The identification and characterization of these cells requires the selection of a well-defined and specific phenotype, and it has been shown that the combination of the Cluster of Differentiation (CD) CD34 and kinase insert domain receptor (KDR), namely CD34+KDR+, is the most commonly used phenotype in the context of cardiovascular disease. However, there is no agreement on the definitive phenotype of EPCs.

Considering the applicability of EPCs as biomarkers of cardiovascular risk, this review is based on an analysis of modifiable and non-modifiable risk factors, present in the general population. Accordingly, the objective is to critically analyse the impact of smoking, physical activity, body weight, age and gender on the number and functional capacity of EPCs.

**Keywords:** endothelial progenitor cells/EPC, cardiovascular risk, smoking, exercise, body weight, age factor/aging, sex/gender.

## 1. Introdução

As células progenitoras endoteliais (CPEs) constituem uma população heterogénea de células estaminais derivadas da medula óssea, presentes na circulação sanguínea em diferentes estádios de maturação [1]. Estas células foram identificadas pela primeira vez no sangue periférico por ASAHARA *et al.* [2] em 1997, e continuam a ser alvo de estudos relativamente às suas capacidades regenerativas/reparadoras visto contribuírem para a neovascularização em diferentes contextos fisiopatológicos [1, 3-5]. Destaca-se o seu papel na regeneração endotelial, neovascularização e determinação de prognóstico em doenças cardiovasculares (DCVs) [6].

## 2. Vasculogénese e Angiogénese

Numa perspetiva tradicional, o termo vasculogénese era apenas utilizado para descrever a formação de vasos sanguíneos no embrião [7, 8], pelo que se pensava que a neovascularização no adulto ocorreria apenas através da angiogénese, ou formação de novos vasos sanguíneos através de vasos pré-existentes [9].

O processo de vasculogénese, que ocorre durante a gestação, envolve a formação de ilhéus sanguíneos através da diferenciação de células da mesoderme em angioblastos [8]. Os ilhéus sanguíneos, constituídos por angioblastos na camada periférica e por células estaminais hematopoiéticas no centro, constituem as primeiras estruturas vasculares detetadas [2, 8]. A formação de vasos sanguíneos pode ocorrer através da união de angioblastos *in situ* ou através da migração de angioblastos para outros locais [9, 10]. Posteriormente, os angioblastos diferenciam-se em células endoteliais para dar origem a uma rede vascular primitiva [8-10].

Após a formação dos primeiros vasos sanguíneos, a rede vascular primitiva formada sofre expansão e remodelação através de angiogénese, que promove a formação de uma estrutura vascular complexa e organizada [7, 9, 11]. São descritos na literatura dois tipos de angiogénese: *Sprouting angiogenesis* e *Intussusceptive angiogenesis* [7, 9]. A *sprouting angiogenesis* ou angiogénese proliferativa ocorre, como o próprio nome indica, através da proliferação ou ramificação de vasos pré-existentes [7, 9]. A degradação proteolítica da matriz extracelular é acompanhada pela migração quimiotática e proliferação de células endoteliais, formação do lúmen e maturação funcional do endotélio. Não se conhecem ao certo os fatores subjacentes à ativação da angiogénese *in vivo*. No entanto, entende-se que o fator de crescimento do endotélio vascular

(*vascular endothelial growth factor*, VEGF) possa ser relevante por ser um fator de crescimento específico do endotélio e, também, um fator quimiotático. A *intussusceptive angiogenesis* ou angiogénese não-proliferativa, por outro lado, é um processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da divisão de vasos pré-existentes por pilares de trans-capilaridade [7, 9]. O tipo de angiogénese que ocorre num determinado tecido ou órgão dependerá, em parte, do número de vasos previamente presentes aquando da fase inicial de crescimento do tecido/órgão [7].

Os processos de vasculogénese e angiogénese estão retratados esquematicamente na Figura 1.

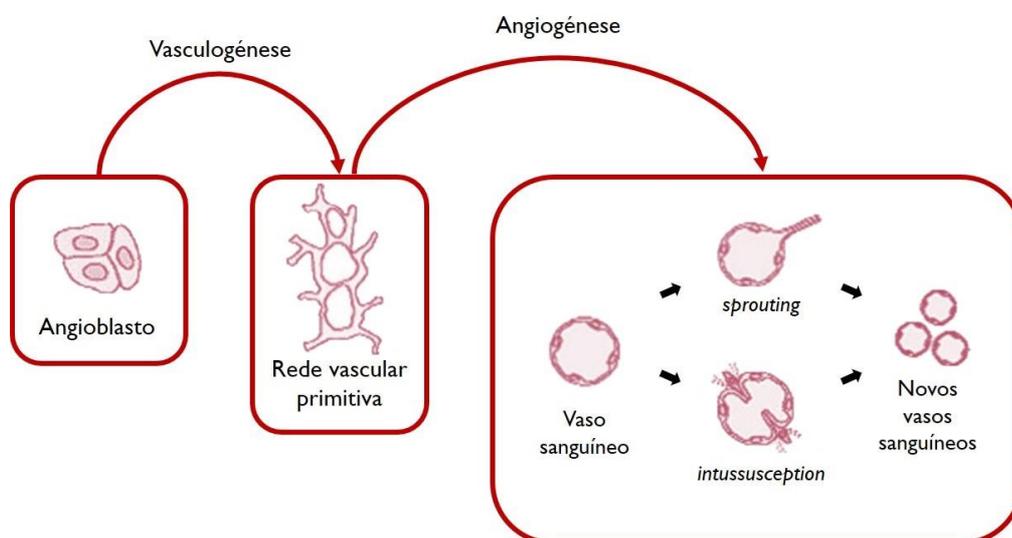


Figura 1 - Formação de vasos sanguíneos através do agrupamento de precursores endoteliais (angioblastos) numa rede vascular primitiva (vasculogénese) que se expande e se remodela (angiogénese). Adaptado de CARMELIET [9].

Não obstante, é de realçar que a vasculogénese não é exclusiva da fase embrionária, tendo também um papel importante em idade adulta. ASAHARA *et al.* [2] demonstrou que as CPEs desempenham um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos, mesmo na ausência de vasos pré-existentes, num processo denominado de vasculogénese pós-natal. Assim, a neovascularização no adulto pode ocorrer através da vasculogénese e da angiogénese.

### 3. Marcadores antigénicos

#### 3.1. Origem das células progenitoras endoteliais

De modo a abordar os marcadores antigénicos que permitem a identificação e caracterização das CPEs, torna-se pertinente perceber o contexto de origem deste tipo de células.

Inicialmente, são formadas na medula óssea células mononucleares que vão dar origem a células progenitoras (CPs). As CPs apresentam potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, salientando-se a hematopoiética e a endotelial [12]. Quando numa diferenciação endotelial, formam-se as CPEs que, *in vivo*, dão origem a células endoteliais maduras [2].

### 3.2. Marcadores

O *cluster of differentiation* (CD) antigénico humano é um conjunto de moléculas bem caracterizadas e expressas à superfície de leucócitos e outros tipos de células [13]. A identificação tanto de CPs como de CPEs é feita através da deteção de marcadores de superfície pertencentes ao CD antigénico humano.

As CPEs apresentam diferentes marcadores consoante os diferentes estádios de maturação [14, 15]. Baseado na definição de CPEs, o perfil antigénico mínimo deve incluir, pelo menos, um marcador característico de célula estaminal ou imaturidade celular, como o CD34 e/ou o CD133 e, pelo menos, um marcador de linhagem endotelial, como o receptor do fator de crescimento vascular endotelial tipo 2 (*vascular endothelial growth factor receptor type 2*, VEGFR2) [16]. O CD34 é um marcador de imaturidade, comum nas linhagens hematopoiética e endotelial [12]. Por sua vez, O CD133 é, também, um marcador de imaturidade celular e baixa diferenciação, expresso em células estaminais hematopoiéticas e CPEs, mas identifica células progenitoras mais imaturas que apenas o CD34 [17, 18]. Quando em co-expressão com o CD34, (CD34+CD133+) identifica populações de CPs com elevada capacidade proliferativa [19, 20]. O VEGFR2, também denominado de *kinase insert domain receptor* (KDR), é um marcador de linhagem endotelial [21]. Desempenha um papel importante durante o processo de vasculogénese e é o principal transdutor na angiogénese fisiológica e na angiogénese patológica [22, 23]. Em co-expressão com o CD34, (CD34+KDR+), identifica populações de CPs com elevado potencial de diferenciação endotelial [16, 24]. As células que expressam os antígenos CD34+CD133+KDR+ e CD133+KDR+ são, de acordo com a literatura, tendencialmente descritas como uma população de CPEs imaturas, enquanto que, células com CD34+KDR+ poderão representar populações de CPEs diferenciadas [21, 25, 26].

É importante referir outros marcadores, como o CD146, característico de células do estroma derivadas da medula óssea [27], o CD31, expresso em células endoteliais e subconjuntos de leucócitos [28] e o CD45, antígeno comum dos leucócitos [29], que têm sido utilizados para identificar CPEs [15, 30]. A deteção simultânea destes marcadores permite, segundo SHIM *et al.* [31], uma identificação mais promissora deste tipo de células. Não obstante,

o CD117 ou recetor do fator de crescimento de células estaminais, um marcador de células progenitoras, o CD184 ou recetor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4), um marcador de *homing* ou direcionamento para locais de dano e o fator *von Willebrand* (vWF), um marcador endotelial, têm sido, de igual forma, propostos para a identificação das CPEs [30, 32-34].

A classificação dos marcadores tendo em conta o estadio de diferenciação é motivo de controvérsia e divergência entre muitos grupos de investigadores. De facto, não estão definidos os tempos precisos da perda de determinado marcador ou o início da expressão de outro. Tomando como exemplo, HRISTOV *et al.* [35] refere não ser conhecido o tempo em que as CPEs começam a perder o marcador de imaturidade CD133 ao longo do percurso de mobilização da medula óssea para a corrente sanguínea, nem quando estas se tornam em células endoteliais maduras completamente diferenciadas. A Figura 2 representa um esquema que realça os marcadores referidos anteriormente e respetiva expressão, desde a mobilização a partir da medula óssea até à incorporação no endotélio vascular.

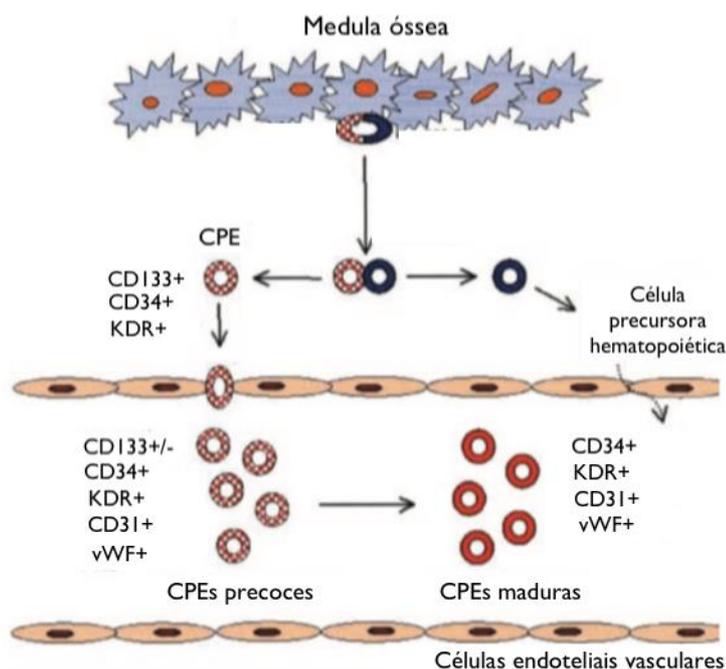


Figura 2 - Mobilização de CPEs da medula óssea até à incorporação no endotélio vascular. Na medula óssea, as CPEs precoces expressam os marcadores CD133, CD34, KDR e quando atingem o estadio de maturação expressam CD34, KDR e vWF, perdendo, naturalmente, o marcador de imaturidade CD133. Adaptado de HRISTOV *et al.* [35].

Devido à elevada quantidade de marcadores disponíveis, torna-se difícil e complexo definir o perfil fenotípico das CPEs [31].

### 3.3. Definição das células progenitoras endoteliais: Limitações

Como anteriormente referido, as CPEs apresentam diferentes marcadores identificativos. Este fenótipo heterogéneo determina uma definição controversa e, ao mesmo tempo, dificulta o conhecimento da biologia *in vitro* ou *in vivo* das CPEs [36].

Um exemplo demonstrador da dificuldade subjacente à identificação das CPEs é o marcador CD45. De modo a aumentar a especificidade para este tipo de células, é aconselhada a identificação através de uma combinação de marcadores [6, 36]. Alguns autores sugerem a utilização do CD45, antigénio comum dos leucócitos [29], de modo a distinguir as células mieloides (CD45+), que mimetizam a morfologia endotelial, de células de linhagem endotelial (CD45- ou CD45dim) [37, 38]. Apesar das CPEs serem inicialmente descritas como CD45-, estudos recentes com aplicação de citómetros de fluxo policromados de maior resolução, revelaram que as CPEs são, na verdade, CD45dim [39]. SCHMIDT-LUCKE *et al.* [6] e colaboradores demonstraram que apenas a fração de células CD45dim contém a população de CPEs relevante para o prognóstico de DCV sugerindo, dessa forma, que estas células representam as verdadeiras CPEs circulantes. De realçar que estas descobertas dever-se-ão, em parte, ao avanço tecnológico evidenciado na área de pesquisa imunológica.

Por outro lado, LEAL *et al.* [36], através da análise de estudos que estabeleceram uma correlação entre os possíveis perfis antigénicos e doenças cardiovasculares (doença arterial coronária e síndromes coronários agudos), demonstrou que o CD34+KDR+ era o fenótipo mais utilizado, seguido do CD34+KDR+CD45dim, e que estes resultados vão de encontro às recomendações relativas à utilização destes fenótipos no contexto cardiovascular [6, 40]. Apesar de o fenótipo das CPEs não estar definido, estas combinações de marcadores são as mais utilizadas tendo em consideração o estudo de DCVs. Não obstante, são necessários mais estudos sobre a especificidade de identificação destas células no âmbito de diferentes condições clínicas.

## 4. Identificação e Caracterização das células progenitoras endoteliais

### 4.1. Métodos

Para a identificação e caracterização das CPEs, a literatura refere dois métodos, utilizados para caracterização quantitativa e qualitativa destas células em diversas situações clínicas: identificação de subpopulações celulares baseada em marcadores de superfície – citometria de fluxo; e identificação baseada na análise de ensaios de cultura celular [1].

#### 4.1.1. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um método que tem sido usado frequentemente com o objetivo de isolar células para posterior análise e é baseada em interações antígeno-anticorpo [41, 42]. Apesar de ser considerada um dos melhores métodos para obter dados quantitativos sobre CPEs, este método apresenta duas importantes limitações a serem discutidas [41]. A primeira limitação diz respeito ao perfil antigénico a ser utilizado, de modo a identificar e quantificar CPEs. Como referido anteriormente, o fenótipo antigénico exato das CPEs não está, ainda, definido e os antígenos que são expressos pelas CPEs são, igualmente, expressos por outras linhagens celulares [38, 41, 43, 44]. De forma a aumentar a especificidade das células que se pretendem estudar, o número de marcadores a ser utilizado deveria, teoricamente, ser o maior possível. No entanto, como segunda limitação ao método de citometria de fluxo, tal não é possível pois, como as CPEs são uma população rara de células na circulação sanguínea, apenas se conseguem obter contagens de CPEs através de citometria de fluxo com um número reduzido de marcadores [38, 41]. Apesar de ambas as limitações, a citometria de fluxo deverá ser tida como escolha preferencial para identificação e quantificação de CPEs [16, 41, 43].

Relativamente aos marcadores de superfície utilizados neste método, como referido anteriormente, deverão ser incluídos, pelo menos, um marcador característico de célula estaminal ou imaturidade celular, habitualmente o CD34 e/ou o CD133 e, pelo menos, um marcador de linhagem endotelial, como o VEGFR2/KDR [6, 16, 45].

A quantificação é realizada através da enumeração de células *naive*, recorrendo ao uso de um fenótipo específico, assim como a identificação de populações celulares específicas, na análise multicelular de seleção de células ativadas por fluorescência [46].

#### 4.1.2. *Cultura Celular*

Contrariamente à citometria de fluxo, a cultura celular possibilita a caracterização qualitativa das CPEs. Através dos ensaios de cultura celular podemos caracterizar as CPEs consoante as suas propriedades qualitativas ao longo do tempo, nomeadamente, CPEs precoces e tardias [14, 47].

As células precoces são as células aderentes com aspecto de células conjuntas, alongadas e fusiformes, após 3 a 5 dias em cultura com fibronectina e meio endotelial [14]. HILL *et al.* [48] descreveu como unidades formadoras de colónias (*colony forming units*, CFUs) as células mononucleares de sangue periférico que após 7 dias do plaqueamento em meio com fibronectina humana, para separação de células endoteliais maduras, se apresentavam em colónias consistindo em múltiplas células finas e planas, a emergir de um aglomerado central de células arredondadas. Este tipo de células foi denominado de células progenitoras endoteliais – *colony forming units* (CPE-CFUs) e sugere-se então que a capacidade de se expandirem e formarem colónias num meio endotelial específico seja uma característica funcional chave das CPEs [48].

Quer as células precoces quer as CPE-CFUs derivam do sistema hematopoiético e expressam tanto marcadores hematopoiéticos como mieloides [16]. No entanto, estes dois tipos de células apresentam diferenças, nomeadamente, na metodologia utilizada uma vez que, para a obtenção de CPEs precoces não existe a inclusão de um passo inicial de pré-plaqueamento, utilizado por HILL *et al.* [48], para remover, com maior celeridade, células endoteliais maduras aderentes e, dessa forma, evitar contaminação. No ensaio para células precoces, as células não aderentes são rejeitadas, restando unicamente células aderentes que pertencerão à população-alvo [14, 16, 48].

As células tardias, por outro lado, aparecem num período de 2 a 4 semanas, posteriormente à etapa do plaqueamento em diferentes matrizes, designadamente, colagénio, gelatina e fibronectina [49]. Estas células tardias apresentam-se com um contorno citoplasmático mais suave, fixadas firmemente à placa e com aspeto de paralelepípedo [14]. Fenotipicamente, este tipo de células expressa marcadores endoteliais e não hematopoiéticos [46]. Os ensaios de cultura celular estão retratados esquematicamente na figura 3.

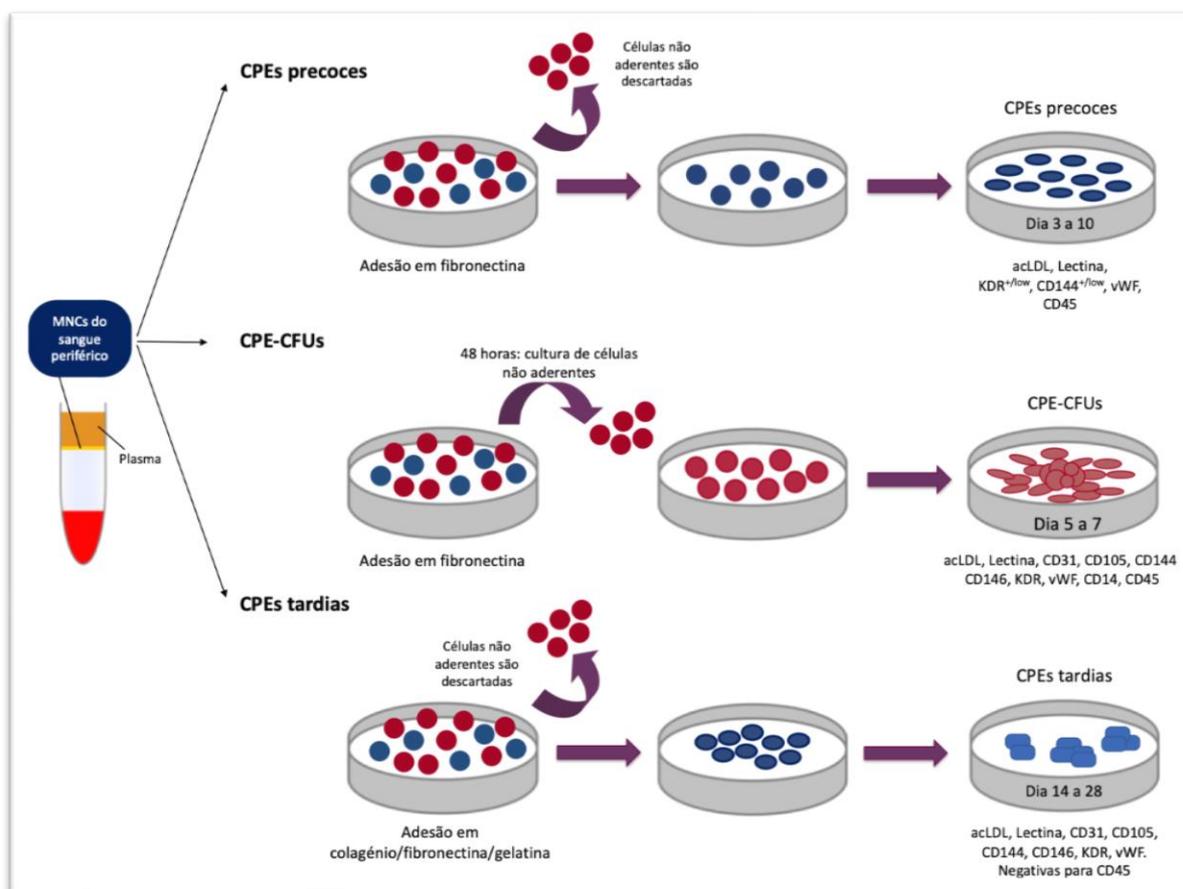


Figura 3 - Ensaio de cultura celular para células progenitoras endoteliais. A figura esquematiza os diferentes ensaios de cultura celular descritos na literatura para as CPEs, nomeadamente CPEs precoces, CPE-CFUs e CPE tardias. acLDL: *low density lipoprotein* acetilada; CD: *cluster of differentiation*; CPEs: células progenitoras endoteliais; CPE-CFUs: células progenitoras endoteliais-*colony forming units* (unidades formadoras de colónias); KDR: *kinase inser domain receptor*; MNCs: células mononucleares; vWF: fator *von Willebrand*. Adaptado de LEAL *et al.* [36].

#### 4.1.3. Limitações aos métodos

Ambos os métodos abordados evidenciam limitações significativas. Na citometria de fluxo, a limitação de maior relevo é a inexistência de um perfil fenotípico específico de CPE. Esta metodologia, para uma maior seletividade, exige maior especificidade nos marcadores utilizados. De facto, como dito anteriormente, alguns autores têm usado diferentes combinações de antígenos de modo a aumentar a especificidade para CPEs, como é o caso do CD45 [37, 38]. Na cultura de células, o estudo qualitativo e quantitativo caracteriza-se por ser pouco específico visto a reprodutibilidade e repetibilidade dependerem unicamente dos métodos utilizados. Este facto faz com que pequenas distinções nas metodologias utilizadas possam culminar em resultados com diferenças significativas [46]. É igualmente importante referir que o

número de CPEs em cultura celular não corresponde necessariamente ao número de CPEs em circulação [50].

Pelo facto de não haver forte consenso no que diz respeito à definição e identificação de CPEs, tanto pela via da citometria de fluxo como por ensaios de cultura celular, torna-se imperativo e necessário a utilização de protocolos normalizados de forma a obterem-se resultados reprodutíveis e passíveis de serem comparáveis, para posterior aplicação na prática clínica [36].

## 5. Etapas de Mobilização, Migração e Incorporação

Por forma a entender as funções das CPEs, torna-se indispensável abordar os diferentes estádios percorridos por estas células.

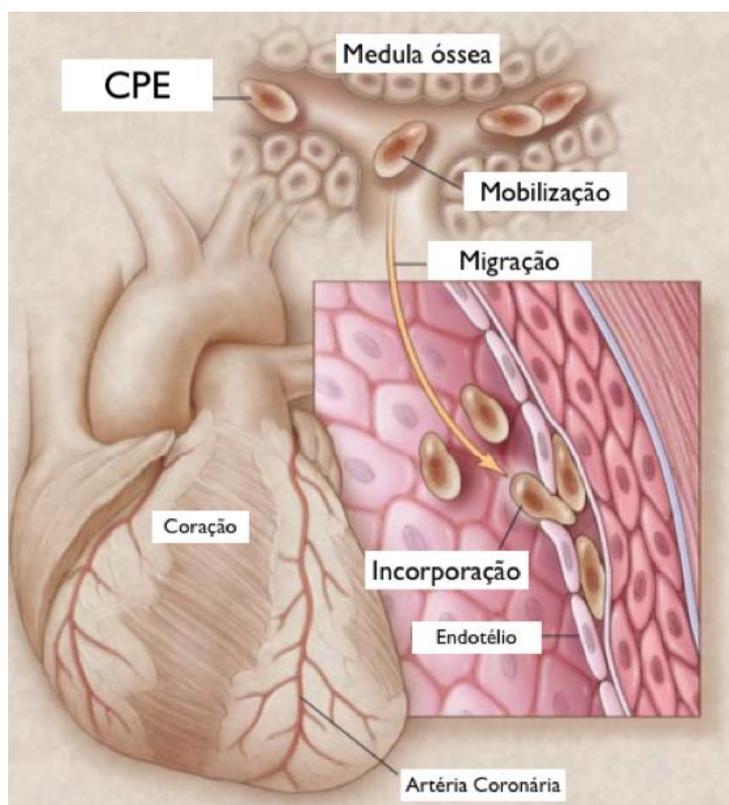


Figura 4 - As três fases ao longo do percurso efetuado pelas CPEs desde a medula óssea até ao endotélio vascular. Adaptado de ROSENZWEIG [52].

As CPEs saem da medula óssea tendo como destino principal o endotélio vascular (Figura 4). Após mobilização da medula óssea para a corrente sanguínea, estas células sofrem migração para locais de isquémia ou lesão vascular [51, 52]. Posteriormente, as CPEs podem ser incorporadas em novos vasos sanguíneos formados por processos angiogénicos (pré-existência de vasos sanguíneos) ou serem incorporadas em processos de formação de vasos através de vasculogénese (sem vasos sanguíneos pré-existent) [51, 52].

## 5.1. Mobilização

A mobilização de CPs da medula óssea é uma importante etapa no processo de reparação de vasos sanguíneos lesados, assim como, na formação de novos vasos.

Na medula óssea coexistem tanto células estaminais como CPs num estado não diferenciado e quiescente [53]. Tal deve-se a um conjunto de sinalizações proveniente de células do estroma, nomeadamente a interação entre o fator derivado das células do estroma (*stromal cell-derived factor-1*, SDF-1) e o CXCR4 presente em células progenitoras que contribui para a retenção destas células na medula óssea [54]. Para que a mobilização seja possível, é necessária a ação proteolítica de enzimas secretadas pelas células estaminais, clivando ligações intercelulares entre CPs e células estromais [55]. A metaloproteinase de matriz tipo 9 apresenta um papel fulcral na libertação destas células, por permitir a quebra da ligação/interação entre o SDF-1 e o CXCR4, anteriormente referida [56, 57]. As CPEs vão, posteriormente, responder perante estímulos como *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1), SDF-1, VEGF, sinais quimiotáticos e quimiocinas, permitindo a sua mobilização para a corrente sanguínea [58-64].

## 5.2. Migração

A migração é considerada uma etapa fulcral no que diz respeito às capacidades funcionais das CPEs. Segundo HRISTOV *et al.* [35], presume-se que a migração seja a fase em que as CPEs iniciam o seu processo de diferenciação, o qual será completado aquando da incorporação no endotélio vascular.

Um tecido em estado de hipóxia promove a libertação de HIF-1 que irá regular a expressão do fator mobilizador SDF-1 [63, 65]. Posteriormente, as CPEs migram para locais de lesão endotelial ou isquémia, acompanhando o gradiente de SDF-1 na corrente sanguínea [64]. O VEGF é, igualmente, libertado durante episódios de isquémia, contribuindo para a neovascularização pós-natal através da mobilização de CPEs até aos locais de lesão, conduzidas, também, por gradiente de concentração [60, 62, 66, 67].

## 5.3. Incorporação

A incorporação ou integração é a última fase no percurso percorrido pelas CPEs. Esta etapa reveste-se de alguma importância devido aos mecanismos subjacentes à interação CPE-endotélio. De facto, os sinais que direcionam as CPEs para locais de lesão e os fatores fisiológicos e/ou patológicos que participam nos processos de incorporação e diferenciação destas

células não estão completamente esclarecidos [35]. Não obstante, estudos recentes sobre a integração de CPEs na camada endotelial demonstraram que uma fração pequena destas células apresentava capacidade de originar células musculares lisas *in vitro*, num processo denominado de transdiferenciação [68] (Figura 5). HRISTOV *et al.* [35] faz referência a uma possível aplicação deste tipo de células *in vivo*, nomeadamente, a incorporação estratégica de CPEs no endotélio vascular. Esta aplicação serviria como ferramenta de emergência na reparação de células endoteliais ou musculares lisas aquando de uma lesão [35].

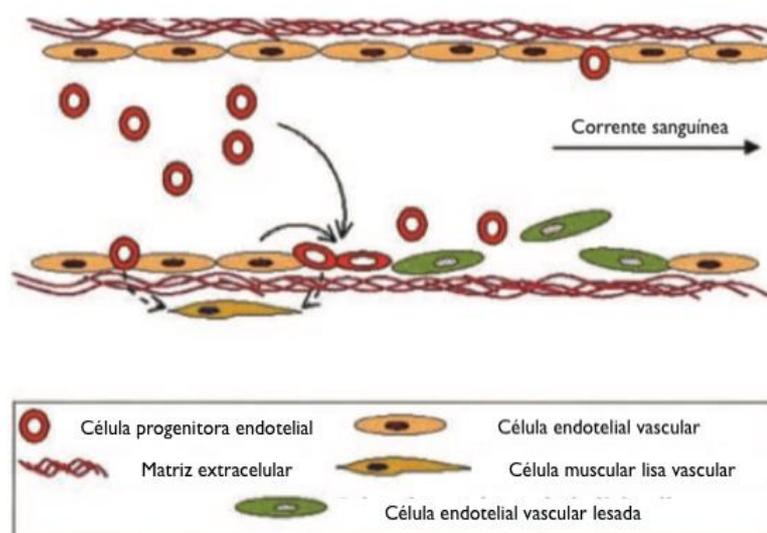


Figura 5 - As CPEs apresentam um papel importante na reparação vascular. Uma subpopulação deste tipo de células poderá sofrer incorporação na monocamada endotelial e transdiferenciar-se em células musculares lisas. Adaptado de HRISTOV *et al.* [35].

## 6. Células progenitoras endoteliais e fatores de risco cardiovascular

Tendo em consideração as capacidades de regeneração/reparação das CPEs, torna-se pertinente entender de que forma estas células atuam não só em determinadas patologias cardiovasculares, como também perante determinados fatores de risco cardiovascular. A determinação do fenótipo que melhor se correlaciona com cada fator de risco poderá fazer dele um biomarcador a utilizar na monitorização futura de risco cardiovascular em indivíduos com maior predisposição. Não sendo exequível o estudo das CPEs em meio controlado e em populações homogêneas, abordar-se-á neste trabalho a influência de fatores de risco modificáveis e não modificáveis nas alterações quantitativas e qualitativas deste tipo de células, recorrendo à análise de estudos compilados através de uma revisão sistemática da literatura. Por conseguinte, a análise obtida será resultado de diferentes estudos publicados no âmbito das CPEs.

A revisão sistemática dos estudos publicados em plataformas online, maioritariamente, PubMed, foi feita com o auxílio das palavras-chave: célula progenitora endotelial/CPE, risco cardiovascular, tabagismo, exercício físico, peso corporal, idade e género. Com estas palavras-chave, foi criada a seguinte frase de pesquisa:

- ("Endothelial Progenitor Cells" OR "EPC") AND "Cardiovascular Risk" AND [fator de risco]

A frase de pesquisa foi modificada para cada fator de risco, originando 5 pesquisas distintas. A última atualização da pesquisa foi realizada a 10 de maio de 2019. Para cada estudo, foi analisada a população alvo, metodologia, resultados e conclusões, quando necessário. Como resultado, serão abordados os seguintes fatores de risco:

#### Fatores de risco modificáveis:

- Consumo de tabaco/tabagismo;
- Exercício/atividade física;
- Peso corporal.

#### Fatores de risco não modificáveis:

- Idade;
- Género.

### 6.1. Fatores de risco modificáveis

#### 6.1.1. *Células progenitoras endoteliais e consumo de tabaco/tabagismo*

O tabagismo é considerado um fator de risco *major* em qualquer idade, fruto das consequências subjacentes ao seu consumo e/ou inalação, promovendo o desenvolvimento de DCVs, assim como o estabelecimento e desenvolvimento de cancro [69]. No extenso conjunto de efeitos adversos e colaterais provenientes do ato de fumar, destacar-se-ão aqueles que afetam direta ou indiretamente o número e a função das CPEs e os mecanismos de reparação vascular.

O efeito do consumo de tabaco sobre as CPEs foi avaliado através da determinação do número de células CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>, por citometria de fluxo, em indivíduos fumadores (n=15; 10 fumadores leves [<20 cigarros/dia] e 5 fumadores considerados pesados

[ $\geq 20$  cigarros/dia]), comparativamente a indivíduos não fumadores (n=14) [70]. Foi demonstrado que os níveis de CPEs são inversamente proporcionais ao número de cigarros consumidos, sendo que, no início do estudo, os valores de CPEs apresentavam-se baixos no grupo de fumadores e elevados no grupo não fumador. Após cessação tabágica, os níveis de CPEs aumentaram rapidamente, verificando-se um aumento significativo no grupo dos fumadores leves, comparativamente ao grupo de fumadores pesados. Posteriormente, verificou-se uma diminuição no número de CPEs com a retoma do tabagismo, para valores semelhantes aos verificados antes da cessação tabágica. A diminuição dos valores de CPEs, dependente do número de cigarros fumados, conduz a uma situação de suscetibilidade, por parte do fumador, a desenvolver doenças do foro cardiovascular.

Outro estudo, com objetivo semelhante ao anterior, nomeadamente a observação de variações no número e propriedades de aderência das CPEs, após cessação tabágica, obteve resultados díspares [71]. As CPEs foram quantificadas através de citometria de fluxo numa amostra de 144 doentes (>50% com doenças ou fatores de risco cardiovascular adicionais) que completaram um período de cessação tabágica de 5 semanas, com recurso aos conjuntos de antigénios de superfície CD34+KDR+ ou CD34+CD133+. Verificou-se que o número de CPEs manteve-se, contrariamente aos dados reportados no estudo anterior. Constatou-se também que, após cessação tabágica, as CPEs CD45<sup>low</sup>CD34+CD133+ em circulação aumentaram, num período temporal de 2 semanas [70]. Estes resultados antagónicos, perante objetivos de estudo similares, poderão dever-se, por exemplo, à inexistência de indivíduos classificados como saudáveis, presentes no estudo de KONDO *et al.* [70]. O estudo de PULS *et al.* [71], para além de não incluir grupo de controlo, compreendia uma incidência superior a 50% de indivíduos com doenças ou fatores de risco cardiovascular adicionais, em que alguns apresentavam farmacoterapia instituída para hipertensão, colesterol ou diabetes, podendo esta apresentar, no caso de fármacos inibidores da 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, influência no número de CPEs, em indivíduos com doença arterial coronária [71].

Um estudo realizado com o âmbito de investigar as características de CPEs CD45<sup>dim</sup>CD34+KDR+ e o impacto da terapia com células estaminais autólogas em fumadores ativos e não-fumadores com enfarte agudo do miocárdio (EAM), chegou à conclusão de que estas células, pelo seu papel fundamental de reparação endotelial, eram determinantes na reparação cardíaca pós-EAM no conjunto de indivíduos não fumadores [72]. Por outro lado, o número de CPEs sofreu decréscimo e estas apresentaram resposta migratória deficiente em fumadores

ativos, comparativamente a não fumadores/antigos fumadores [72]. Este decréscimo poderá ser consequência de um conjunto de fatores: escassez de células progenitoras na medula óssea; capacidade funcional da medula óssea comprometida; mobilização reduzida de CPEs ou a diminuição da sobrevivência e/ou diferenciação de CPEs mobilizadas [73, 74]. Adicionalmente, é de salientar que as CPEs, em fumadores considerados pesados, morrem de forma prematura durante fases iniciais de cultura [70]. Apesar das evidências clínicas demonstrarem as consequências fisiopatológicas em número e capacidade funcional das CPEs, é destacada, de forma positiva, a capacidade reparadora da terapia com células estaminais autólogas, que permite a anulação dos efeitos subjacentes às alterações das CPEs em fumadores ativos [72].

Um estudo diferente pretendia investigar se a pitavastatina, um inibidor da HMG-CoA redutase, tem influência na reparação endotelial em fumadores crónicos, por via das suas propriedades antioxidantes [75]. Foram estudados 30 fumadores crónicos do género masculino, tendo sido divididos em grupo experimental (administração de pitavastatina na dose diária de 2mg) e grupo de controlo (sem administração do fármaco). A pitavastatina, apesar de não ter alterado os valores de CPs CD45<sup>low</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>, quantificadas através de citometria de fluxo, e de CPEs (duplamente positivas para a absorção de *low-density lipoprotein* (LDL) acetilada e ligação à lectina *fluorescein isothiocyanat-Ulex europaeus-I*, FITC-UEA-I), quantificadas através de cultura celular, demonstrou um impacto significativo na recuperação da função endotelial, assim como uma redução considerável nos níveis de stress oxidativo, comparativamente com o grupo de controlo [75]. De referir que os inibidores da HMG-CoA redutase têm sido estudados com o intuito de validar os seus efeitos pleiotrópicos, verificando-se uma capacidade reparativa no tabagismo crónico, através de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios [76, 77]. Os resultados demonstraram igualmente que a disfunção endotelial presente nos fumadores crónicos poderá ser ultrapassada pelas propriedades antioxidantes da pitavastatina, o que revela uma importante capacidade de reparação da função endotelial [75].

### 6.1.2. Células progenitoras endoteliais e o exercício físico

A prática de exercício físico é uma medida não farmacológica de extrema importância para a promoção da saúde em indivíduos saudáveis e pela sua qualidade terapêutica em indivíduos com DCVs [78], pelo papel reparador e de proteção da função cardiovascular [79]. Há evidência científica de que o exercício físico potencia a mobilização de CPEs a partir da medula óssea [80]. Torna-se, deste modo, pertinente o estudo da relação entre o exercício e possíveis biomarcadores de risco cardiovascular, como as CPEs.

Um estudo com a finalidade de observar o efeito que o tratamento combinado de exercício físico e dieta supervisionada promove na função microvascular em adolescentes obesos determinou o número de CPEs CD34+KDR+CD45dim através de citometria de fluxo [81]. A quantificação ocorreu em dois grupos: grupo de intervenção (n= 33; género feminino: 24; género masculino: 9; média de idades:  $15,4 \pm 1,5$  anos), ao qual foi aplicada uma restrição calórica de 1500-1800 quilocalorias diárias e instituído um treino específico, focado, essencialmente, na função cardíaca (corrida, bicicleta e natação); grupo de controlo (n= 28; género feminino: 22; género masculino: 6; média de idades:  $15,1 \pm 1,2$  anos), cujos indivíduos foram apenas aconselhados a seguir um plano de restrição calórica e encorajados a praticar exercício físico. Após 5 meses de avaliação, observou-se um aumento no número de CPEs no grupo de intervenção comparativamente ao grupo controlo, para além de valores benéficos noutros parâmetros em estudo, como o perfil lipídico, capacidade física e perda de peso [81]. Curiosamente, ao décimo e último mês do estudo, a contagem de CPEs diminuiu no grupo de intervenção, o que, de certo modo, gera alguma divergência de ideias relativamente ao que seria esperado. Tal dever-se-á à libertação de um elevado número de CPEs da medula óssea para a corrente sanguínea no início do estudo por mecanismos de vasculoproteção. Posteriormente terá ocorrido incorporação das células no endotélio, ocorrendo o processo de reparação, diminuindo a disponibilidade de CPEs na corrente sanguínea [81, 82].

Outro estudo com o objetivo de avaliar o efeito do exercício físico no número de CPEs em doentes submetidos a transplantação renal, determinou, por citometria de fluxo, o número de CPEs CD34+CD45lowKDR+ em dois grupos de estudo: intervenção e controlo [83]. O grupo de intervenção era constituído por 26 indivíduos (género feminino: 7; género masculino: 19; média de idades:  $57,5 \pm 10,0$  anos) que receberam plano de exercício físico em bicicleta ergométrica, e o grupo de controlo de 36 indivíduos (género feminino: 13; género masculino: 23; média de idades:  $54,8 \pm 12,0$  anos), que não receberam plano de exercício físico. Após 6 meses de estudo, os resultados obtidos demonstraram um decréscimo no número de CPEs no grupo de intervenção, comparativamente ao grupo controlo. De acordo com o autores do estudo, este decréscimo de CPEs no grupo sujeito a exercício físico orientado e planificado poderá dever-se à ação inesperada por parte dos imunossuppressores (ciclosporina ou tacrolímus) na medula óssea, utilizados em contexto de transplante, estando, todavia, desconhecido o mecanismo subjacente [83, 84]. Outra explicação poderá basear-se numa ativação crónica

de mecanismos reparadores, pela exposição a múltiplos fatores de risco e conseqüente estabilização desses mecanismos pelo exercício físico [83], culminando numa diminuição de CPEs, à semelhança do estudo anterior [81].

Um outro estudo, no contexto da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), investigou o número de CPEs após exercício físico de elevada intensidade, nomeadamente teste de esforço em bicicleta ergométrica [82]. Para tal, quantificaram através de citometria de fluxo as CPEs CD34+KDR+ em 7 indivíduos sedentários com ICC e 8 indivíduos saudáveis (4 jovens e 4 de idade avançada), representativos de um grupo controlo. Foram feitas determinações pré e pós exercício físico, tendo-se observado, no grupo com ICC, pouca variação no número de CPEs ao longo do tempo (Figura 6). De facto, este grupo não apresentou aumentos significativos no número de CPEs comparativamente ao grupo controlo e, de acordo com os autores do estudo, tal pode dever-se à supressão da medula óssea por citocinas pró-inflamatórias ou diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador que participa igualmente na mobilização das CPEs a partir da medula óssea [82]. Outra interpretação poderá incidir no facto dos valores basais pré-exercício do grupo de estudo serem semelhantes ou até superiores aos valores do grupo controlo numa tentativa de reparação vascular por parte de CPEs CD34+KDR+, revelando-se por um aumento compensatório em doentes com ICC leve a moderada [82, 85]. Por conseguinte, a carga oxidativa pós exercício físico de elevada intensidade poderá ser insuficiente para estimular ainda mais, a medula óssea que já está, pelo contexto patológico, exacerbada [82, 85].

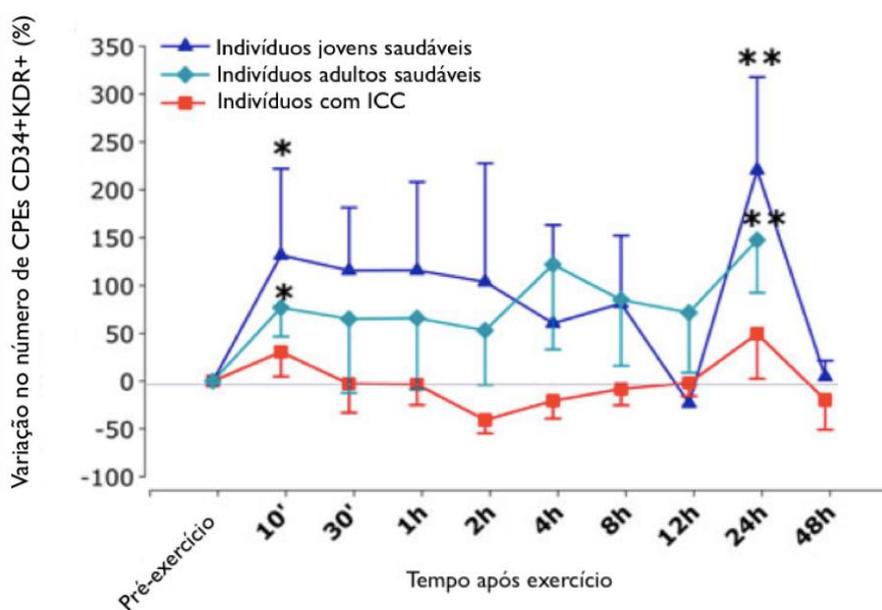


Figura 6 - Variação de CPEs CD34+KDR+ ao longo do tempo após teste de esforço em indivíduos com ICC, comparando com indivíduos jovens e adultos saudáveis. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. da variação em percentagem relativa ao valor basal. \*  $p < 0,05-0,1$ ; \*\*  $p < 0,05$ , vs. valor basal. Adaptado de VAN CRAENENBROECK *et al.* [82].

Com o intuito de investigar o efeito de exercício físico intenso de curta duração no número de CPEs em indivíduos saudáveis [86], procedeu-se à quantificação de CPEs CD34+KDR+ por citometria de fluxo em 2 grupos: grupo 1 (n=11; intervalo de idades: 20-30 anos) e grupo 2 (n=14; intervalo de idades: 20-50 anos). A atividade física baseou-se num único teste de esforço cardiopulmonar até à exaustão, efetuado em bicicleta ergométrica. Apesar de não haver termo de comparação com grupo controlo, segundo os autores do estudo, os resultados obtidos permitem 3 conclusões: 1) o exercício físico intenso de curta duração aumenta o número de CPEs CD34+KDR+; 2) este aumento é considerável em indivíduos com perfil lipídico menos favorável, mesmo que dentro dos limites normais (elevado colesterol LDL e elevada razão colesterol total/ *high-density lipoprotein*, HDL) e, por último, 3) a mobilização de CPEs verificada poderá ser resultante da ação do VEGF, que foi quantificado no presente estudo em níveis elevados [86].

O exercício físico praticado no local de trabalho tem sido referido como uma medida benéfica, no entanto, não foram reportados dados relativos à função endotelial, perfil lipídico e perda de peso associados a esta prática [87]. Como tal, um estudo incluiu 72 trabalhadores em contexto de escritório e laboratório (género feminino: 58; género masculino: 14; média de idades: 45 anos) num programa de exercício físico de corrida em passadeira durante 3 meses. Foi realizada quantificação de CPEs CD133+KDR+ por citometria de fluxo, assim como a medição do perfil lipídico e IMC. Os resultados obtidos revelaram melhoria do perfil lipídico (diminuição de colesterol total e LDL); variação insignificante no peso corporal e aumento do número de CPEs relativamente aos valores basais quantificados antes do estudo [87]. Estes resultados demonstram, por conseguinte, que o exercício físico diário, passível de ser realizado em contexto de local de trabalho por indivíduos classificados como sedentários, melhora a função endotelial, ainda que sem redução significativa do peso corporal, diminuindo o risco cardiovascular [87].

### 6.1.3. *Células progenitoras endoteliais e o peso corporal*

O peso corporal é um fator de risco cardiovascular de relevante importância em qualquer faixa etária. Alguns estudos clínicos determinaram uma relação causal entre o aumento do peso corporal e DCVs, incluindo aterosclerose coronária, ICC, arritmias e acidente vascular cerebral [88-90]. No que concerne a obesidade, esta é frequentemente acompanhada por um conjunto de comorbilidades e distúrbios metabólicos, nomeadamente, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina [91]. Um contexto que manifeste fatores de risco cardiovascular,

acompanhados por inflamação sistêmica e aumento de *stress* oxidativo associado ao excesso de peso, poderão culminar na lesão e disfunção endotelial em indivíduos obesos [92]. Desta forma, poderá existir uma relação entre o peso corporal e as CPEs.

Um estudo que incluiu 120 crianças e adolescentes (género feminino: 59; género masculino: 61; intervalo de idades: 6-17 anos) com obesidade de grau I (IMC: 30,0-34,9 kg/m<sup>2</sup>) e 41 crianças e adolescentes saudáveis (género feminino: 12; género masculino: 29; intervalo de idades: 6-17 anos), representativas de grupo controlo (IMC normal), tinha como objetivo investigar a relação entre o número de CPEs e a ativação endotelial [93]. Para tal, foram quantificadas por citometria de fluxo, CPEs com, no mínimo, um marcador de imaturidade (CD34 e CD133), assim como um marcador de linhagem endotelial (KDR e CD146). Os resultados obtidos referentes ao IMC demonstraram um número superior de CPEs no grupo de indivíduos obesos comparativamente ao grupo controlo, de indivíduos não obesos [93] (Figura 7).

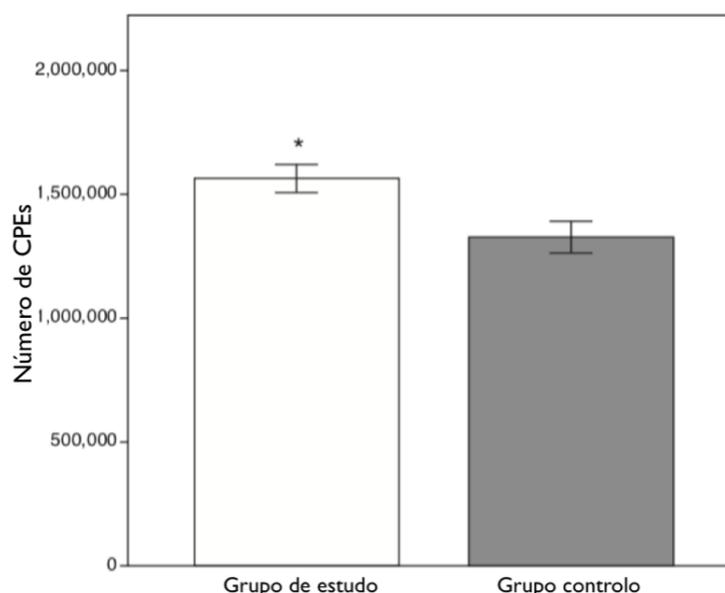


Figura 7 - Comparação do número de CPEs entre grupo de obesos e grupo de não obesos (controlo). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 100 e 29 indivíduos por grupo, respetivamente. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student. \*  $p < 0,01$  vs grupo não-obeso. Adaptado de PIRES *et al.* [93].

Outro estudo teve como propósito investigar o impacto da obesidade e perda de peso na capacidade angiogénica e reparadora das CPEs [94]. Com este objetivo determinaram, por cultura celular, a capacidade funcional de CPEs CD31+CD144+KDR+ em 49 indivíduos obesos (grupo de estudo; IMC  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup>; género feminino: 31; género masculino: 18; média de idades:  $42 \pm 14$  anos) e 49 indivíduos saudáveis (grupo controlo; IMC: 20-25 kg/m<sup>2</sup>; género feminino: 28; género masculino: 21; média de idades:  $38 \pm 11$  anos). Os resultados obtidos

demonstram, em primeiro lugar, comprometimento da função endotelial no grupo de indivíduos obesos, pela reduzida capacidade migratória, angiogénica e de aderência observadas. Em segundo lugar, estes resultados foram associados a alterações no perfil de mobilização de CPEs, com redução da resposta a estímulos angiogénicos. Por último, constatou-se que, através da perda significativa de peso, poder-se-á reverter a deficiente capacidade funcional das CPEs [94].

Com o objetivo de investigar se a formação de adipócitos tem influência no número de CPEs e capacidade de formação de colónias [95], o número de CPEs CD45-CD34+KDR+CD133+ e CD45-CD34+ foi quantificado por citometria de fluxo em 67 indivíduos adultos: 25 com peso normal ( $IMC \leq 25 \text{ kg/m}^2$ ; género feminino: 13; género masculino: 12); 18 com excesso de peso ( $IMC: 25-29,9 \text{ kg/m}^2$ ; género feminino: 6; género masculino: 12) e 24 obesos ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ; género feminino: 6; género masculino: 18). Os resultados obtidos permitiram verificar um número de CPEs inferior em obesos, comparativamente a indivíduos com excesso de peso e peso normal. Relativamente à capacidade de formação de colónias, esta foi significativamente inferior em obesos e indivíduos com excesso de peso quando comparados com os de peso normal. Segundo este estudo, as deficiências quantitativas e funcionais das CPEs poderão contribuir para o risco cardiovascular relacionado com a formação de adipócitos [95].

Outro estudo perspetivou a determinação do número de CPEs em adolescentes e avaliou a influência que o excesso de peso apresenta como fator de risco de DCVs [96]. Para tal, foram incluídos 79 adolescentes do género masculino (intervalo de idades: 13-17 anos), dos quais 42 com peso normal e 37 com excesso de peso. Como grupo controlo, foram incluídos 41 adultos saudáveis do género masculino (média de idades:  $32 \pm 7$  anos). As CPEs CD34+CD133KDR+ e CD34-CD133+KDR+ foram quantificadas por citometria de fluxo [96]. Comparativamente ao grupo de peso normal e grupo controlo, o grupo de indivíduos obesos demonstrou um número de CPEs CD34-CD133+KDR+ superior. O número de CPEs CD34+CD133+KDR+ foi inferior no grupo de obesos o que, de acordo com os autores do estudo, pode significar que as células CD34 (-) são mais sensíveis ao risco precoce e, por conseguinte, poderão representar um marcador biológico de dano vascular oculto [96]. Contrariamente ao esperado, o número de CPEs é, na globalidade, inferior nos adolescentes comparativamente aos adultos [96].

WESTERWEEL *et al.* [97] determinou o número de CPEs em indivíduos sem DCV declarada mas com risco CV elevado devido à obesidade e à presença de síndrome metabólica. Neste estudo foram incluídos 20 indivíduos obesos do sexo masculino (intervalo de idades: 18-70 anos; IMC: 25-35 kg/m<sup>2</sup>) e 10 indivíduos saudáveis do sexo masculino (intervalo de idades igual; IMC: 18,5-24,9 kg/m<sup>2</sup>). Foi demonstrado que o número de CPEs CD34+KDR+ é significativamente mais reduzido (cerca de 40%) em indivíduos obesos do sexo masculino com síndrome metabólica, mesmo sem DCV declarada, comparativamente a indivíduos saudáveis. Perante estes resultados, os autores do estudo sugerem que a redução no número de CPEs poderá ser um fenómeno fisiopatológico precoce e potencialmente etiológico no desenvolvimento da aterosclerose, que pode contribuir para o risco de eventos cardiovasculares no futuro [97].

BRUYNDONCKX *et al.* [98] estudou a relação entre disfunção endotelial microvascular e as CPEs em crianças obesas e crianças com um peso corporal normal [98]. Para tal, foram incluídas 57 crianças obesas (grupo de estudo; média de idades: 15,2 ± 1,4 anos) e 30 crianças com peso normal (grupo controlo; média de idades: 15,4 ± 1,5 anos). Foi demonstrado que o número de CPEs CD34+KDR+CD45dim é significativamente inferior em crianças obesas, comparativamente a crianças com peso normal, e que crianças obesas apresentam uma função endotelial comprometida, com declínio da capacidade de reparação do endotélio vascular [98].

Por fim, MULLER-EHMSEN *et al.* [99] estudou a relação entre o número de CPs, entre as quais CPs CD34+KDR+, e o IMC, em 149 indivíduos, maioria dos quais obesos (grupo único; média de idades: 52,5 ± 12,0 anos; IMC médio: 31,6 ± 5,1 kg/m<sup>2</sup>; género feminino: 77; género masculino: 72) [99]. Os resultados obtidos demonstraram uma relação inversa entre o número de CPs e o IMC, ou seja, para um aumento do IMC, o número de CPs diminui [99] (Figura 8). Apesar dos autores deste estudo apresentarem resultados semelhantes para diferentes fenótipos de CPs, destacam-se acima as CPs CD34+KDR+ visto que, segundo este e outros estudos, as células CD34+KDR+ deverão ser classificadas como CPEs, células estas com funções na reparação endotelial [40, 99].

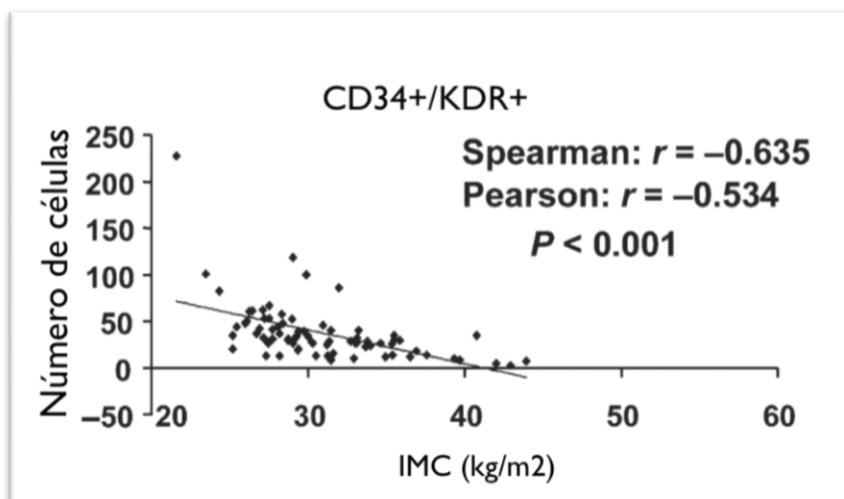


Figura 8 - Correlação entre IMC e o número de CPs. Adaptado de MULLER-EHMTSEN *et al.* [99].

## 6.2. Fatores de risco não modificáveis

### 6.2.1. Células progenitoras endoteliais e a idade

O desencadear de determinadas patologias ocorre num espaço temporal, por vezes, bem definido. Frequentemente, a determinação clara da idade onde se estabelece determinada condição patológica, é o fator principal para uma resposta eficaz e célere. O risco de desenvolvimento de DCV depende da presença ou ausência de fatores de risco tradicionais. No entanto, a idade é um fator de risco cardiovascular independente, e enquanto que os fatores de risco tradicionais podem ser modificáveis, a idade, evidentemente, não é [100]. As propriedades celulares sofrem alterações significativas com a progressão da idade e são estas alterações que provocam o processo de envelhecimento do organismo, assim como doenças crónicas relacionadas com a idade [101]. Deste modo, pretende-se abordar a relação entre as CPEs e a idade.

Um estudo realizado com 9 crianças/adolescentes (intervalo de idades: 8–15 anos) com diabetes *mellitus* tipo I (DMT1), teve como objetivo a determinação dos efeitos da terapêutica antioxidante através da administração de vitamina C e E. Desta forma, avaliaram-se: a capacidade antioxidante; os marcadores inflamatórios (proteína C-reativa e Interleucina-6); a função endotelial; e definiram-se as respetivas relações [102]. Foram ainda avaliados os efeitos associados a um mês de terapia antioxidante combinada no número de CPE-CFUs CD34+CD133+CD45-, através de citometria de fluxo. Com diagnóstico de DMT1 estabelecido, foi iniciada, posteriormente, insulino-terapia, não sendo permitida a inclusão de qualquer

fármaco hipoglicemiante [102]. A hiperglicemia crônica que caracteriza a DMT1, promove o stress oxidativo e consequente desregulação da função endotelial [103, 104] e dos mecanismos de defesa antioxidantes do organismo. Em crianças/adolescentes com DMT1, a quantidade de vitaminas C e E é reduzida pois estas dependem dos mecanismos de defesa antioxidantes acima referidos [105, 106]. Neste estudo, os resultados demonstraram que não houve alterações no número prévio de CPEs e posteriormente à administração de vitamina C e E, pelo que serão necessários estudos de longa duração para investigar quais os possíveis efeitos de uma terapêutica antioxidante combinada [102].

Com o propósito de investigar se os níveis de CPEs são mais elevados durante a infância comparativamente à idade adulta, um estudo quantificou, por citometria de fluxo, o número de CPEs CD34+KDR+ e células estaminais hematopoiéticas CD34+ em 16 crianças saudáveis (média de idades: 7 anos; intervalo de idades: 1-17 anos) e 35 adultos (média de idades: 45 anos; intervalo de idades: 22-81 anos), igualmente saudáveis [107]. Observou-se, por conseguinte, uma relação inversa entre os níveis de CPEs e a idade, tendo-se verificado um valor três vezes superior de CPEs no grupo composto por crianças relativamente ao grupo de adultos (Figura 9). Estes resultados permitem inferir que, possivelmente, durante a infância existe maior capacidade regenerativa vascular do que na idade adulta [107].

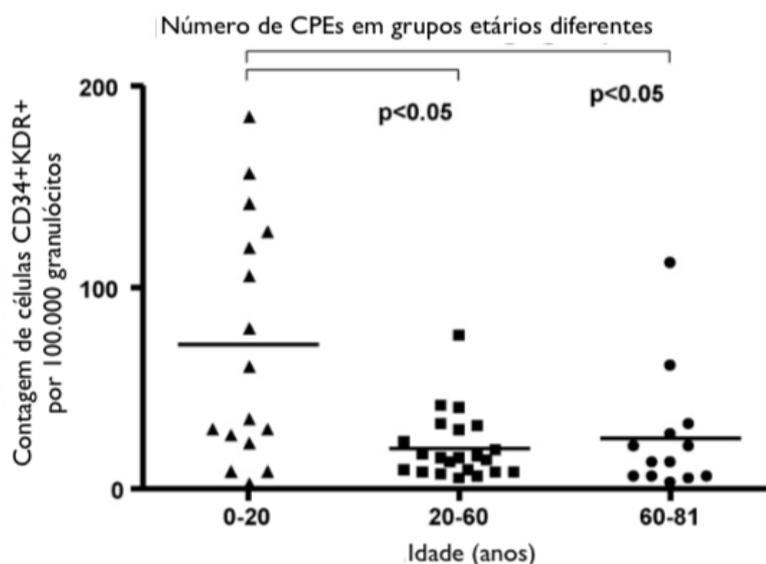


Figura 9 - Comparação do número de CPEs CD34+KDR+ em diferentes grupos etários. O número de CPEs é três vezes superior em crianças comparativamente à idade adulta. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.D.  $72 \pm 60$  vs.  $22 \pm 22$  células CD34+KDR+ por 100.000 granulócitos,  $p < 0,0001$ . Adaptado de JIE et al. [107].

Dado tratar-se de uma amostra relativamente reduzida, são necessários mais estudos focados nos mecanismos subjacentes aos elevados níveis de CPEs observados durante a infância. Deste modo, poder-se-ão obter possíveis aplicações para o aumento de CPEs em adultos com DCVs, de forma a potenciar os mecanismos de reparação endotelial [107].

Outro estudo investigou se a disfunção endotelial associada à idade é acompanhada por alterações qualitativas e quantitativas nas CPEs [108]. Para tal, os autores do estudo utilizaram, como amostra, 20 indivíduos adultos jovens (média de idades:  $25 \pm 1$  anos) e 20 indivíduos adultos em idade avançada (média de idades:  $61 \pm 2$  anos), todos saudáveis. Por meio de citometria de fluxo, quantificaram-se as CPEs marcadas por CD34+KDR+, obtendo resultados similares entre ambos os grupos em estudo. No entanto, como anteriormente referido, foi igualmente realizada análise qualitativa, com foco nas alterações funcionais das CPEs. Assim sendo, verificou-se que o grupo de adultos com idade avançada apresentava uma redução quer na capacidade proliferativa quer na resposta migratória das CPEs, comparativamente ao grupo de adultos jovens [108]. Segundo este estudo, a atividade reparadora vascular das CPEs poderá ser atenuada com a idade, não por diminuição do número de CPEs de maturação, CD34+KDR+, ou imaturas, CD133+KDR+, mas sim por défice funcional [108]. Uma possível explicação destes resultados contrariarem os do estudo de JIE *et al.* [107] será o facto de, nesse estudo, ter sido utilizado um grupo representativo da idade infantil, ao invés da comparação feita entre adultos jovens e de idade avançada, por HEISS *et al.* [108].

Outro estudo quantificou o número de CPEs CD34+CD133+CD45<sup>low</sup> em 135 doentes (média de idades:  $63,3 \pm 15,6$  anos) hospitalizados com DCV e 25 indivíduos saudáveis (média de idades:  $27,3 \pm 9,1$  anos) [109]. Esta quantificação foi realizada por citometria de fluxo verificando-se a existência de uma relação inversa entre o número e a idade, em que a idade é considerada como um fator de risco para a redução do número de CPEs [109]. Apesar dos resultados estarem de acordo com os resultados do estudo de JIE *et al.* [107], dever-se-á ter em atenção que o grupo de estudo com idade avançada apresenta, ao mesmo tempo, DCV, pelo que a comparação feita com adultos jovens saudáveis carece de condições adequadas para confrontação de resultados.

Por outro lado, um estudo realizado com 32 indivíduos saudáveis (intervalo de idades: 20-61 anos) quantificou, por citometria de fluxo, CPEs CD34+KDR+, CD34+CD62E+ (CD63E como marcador endotelial) e CD34+CD31+, tendo observado que nenhum dos 3 tipos de CPEs apresentava correlação entre o número de células e a idade [110].

### 6.2.2. Células progenitoras endoteliais e o género

As DCVs são passíveis de apresentarem fatores de risco associados que se traduzem, por vezes, em características intrínsecas como é o caso do género. As diferenças entre género são inequívocas e, de facto, apresentam elevado impacto em fases como a adolescência, menopausa no género feminino e andropausa no género masculino. A influência que o género e as hormonas sexuais possam ter nas CPEs permanece ainda motivo de controvérsia [12].

Um estudo com o propósito de determinar, em adultos jovens com DM1, as diferenças entre género relativamente a controlo glicémico, fatores de risco cardiovascular e variações nas CPEs, quantificou CPEs CD133+KDR+ e CD34+KDR+CD133+ de 300 doentes (género masculino: 168; género feminino: 132; intervalo de idades: 18-30 anos) através de citometria de fluxo [111]. Por comparação com os homens, as mulheres apresentavam níveis superiores de hemoglobina glicada (HbA1c), índice de massa corporal (IMC) e colesterol HDL. No entanto, a contagem de CPEs CD133+KDR+ e CD34+KDR+CD133+ foi inferior relativamente ao género masculino [111].

Outro estudo, realizado em 642 indivíduos (género feminino: 440; género masculino: 202; média de idades= 48 anos), determinou as diferenças no número de CPs tendo em consideração o género [12]. De forma breve e tal como anteriormente explicado, as CPs são células com origem na medula óssea que sofrem diferenciação em linhagem endotelial ou hematopoiética. A quantificação, realizada através de citometria de fluxo, determinou o número de CPs CD34+KDR+, CD34+KDR+CD133+ e CD34+CXCR4+KDR+ e de células progenitoras hematopoiéticas CD34+, CD34+CD133+, CD34+CXCR4+ e CD34+CXCR4+CD133+ [12]. Os resultados obtidos permitem inferir que, para a linhagem hematopoiética, as mulheres, de uma forma geral, apresentam valores inferiores de CPs, comparativamente com os homens. No entanto, não se observaram diferenças significativas entre géneros no número de CPs com diferenciação endotelial [12].

Com o objetivo de investigar a relação entre o número e função das CPEs relativamente ao colesterol LDL e HDL [112], foram estudados 80 indivíduos (género feminino: 39; género masculino: 41; intervalo de idades: 35-45 anos), diagnosticados com hipercolesterolemia, tendo-se efetuado quantificação de CPEs CD133+CD34+. Foram igualmente estudados 78 indivíduos saudáveis (género feminino: 38; género masculino: 40), representativos de grupo de controlo. Os resultados obtidos demonstraram que os indivíduos, tanto do género masculino como do género feminino, com elevados valores de colesterol LDL, apresentavam quer valores reduzidos de CPEs quer capacidade migratória deficiente [112] (Figura 10).

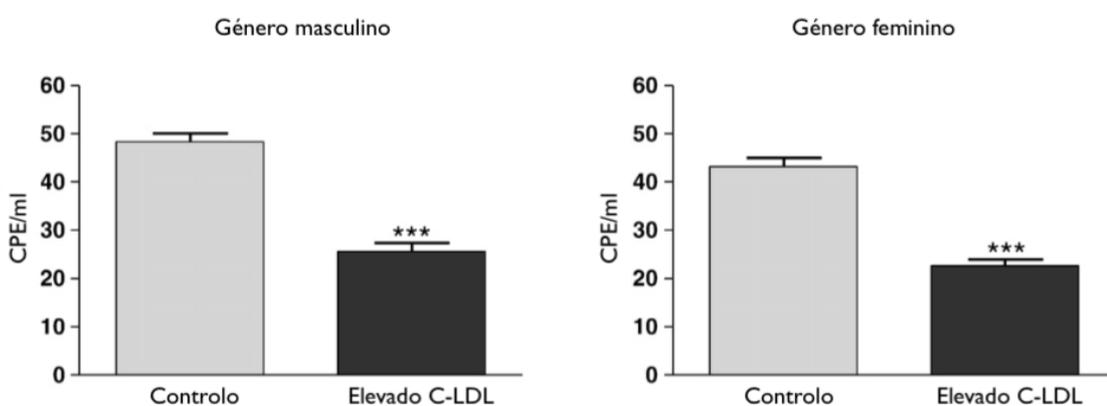


Figura 10 - Comparação do número de CPEs considerando género e perfil colesterolémico. O número de CPEs diminui em ambos os géneros em indivíduos hipercolesterolémicos. C-LDL: colesterol LDL. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. \*\*\* ( $p < 0,0001$ ) vs. grupo controlo. Adaptado de ROSSI *et al.* [112].

Outro estudo que pretendia analisar o número de CPEs e sua função relativamente ao risco cardiovascular, género e estado reprodutivo, quantificou CPEs CD34+KDR+ em 210 indivíduos saudáveis, por citometria de fluxo [113]. O género feminino ( $n=106$ ) foi dividido em grupo fértil ( $n=64$ ) e grupo pós-menopausa ( $n=42$ ). Da mesma forma foi realizada divisão no género masculino ( $n=104$ ; grupo fértil: 59; grupo da mesma faixa etária do grupo pós-menopausa: 45). Os resultados obtidos revelaram valores de CPEs superiores em mulheres férteis comparativamente aos homens. Contudo, observaram-se valores similares entre mulheres na pós-menopausa e homens da mesma faixa etária [113]. A carga hormonal/ciclo menstrual em idade fértil poderá ser a causa favorável para um elevado número de CPEs nas mulheres [113].

Ainda neste estudo, foi realizada quantificação de CPEs CD34+KDR+ no cordão umbilical de recém-nascidos, crianças pré-púberes e idosos de forma a determinar as variações de CPEs entre género ao longo do tempo [113]. Verificaram, por conseguinte, que recém-nasci-

dos do género feminino tinham um valor superior de CPEs comparativamente ao género masculino. Contudo, o panorama invertia em idade pré-púbere com valores superiores no género masculino (Figura 11). No grupo de idosos, não se verificaram variações substanciais nos valores de CPEs [113].

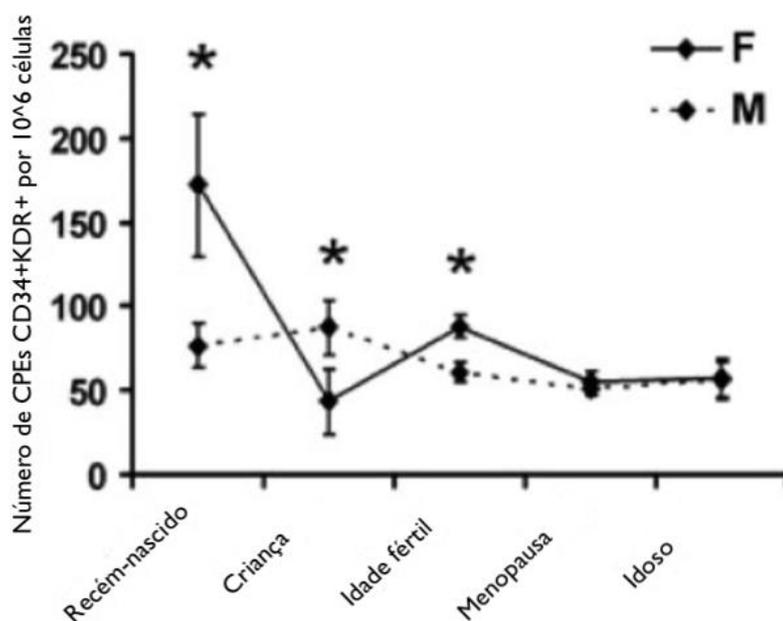


Figura 11 - Variação do número de CPEs, para ambos os géneros, desde recém-nascido até sénior (idoso). F: Género feminino; M: Género masculino. \*  $p < 0,05$  homem vs. mulher. Adaptado de FADINI *et al.* [113].

Para se investigar a correlação entre o número de CPEs e a atividade física em crianças e adolescentes obesos numa população de 24 jovens (género masculino: 9; género feminino: 15), quantificaram-se CPEs CD34+, KDR+CD34+, CD133+CD34+ e CD117+CD34+ por citometria de fluxo [114]. Os resultados deste estudo demonstraram a hipótese de que o exercício físico e o risco cardiovascular, em populações de elevado risco, estão inversamente correlacionados. No entanto, não se verificaram diferenças significativas na contagem de CPEs entre os géneros [114].

## 7. Conclusão

As células progenitoras endoteliais são uma ferramenta indispensável na reparação endotelial. Ao longo das últimas duas décadas, os estudos sobre a capacidade funcional das CPEs têm sido realizados em diferentes contextos fisiológicos e patológicos sendo, dessa forma, importante entender a dinâmica destas células de modo a construir alvos terapêuticos de interesse.

Este trabalho incidiu essencialmente sobre o impacto destas células no organismo humano, nomeadamente tendo como pano de fundo diferentes fatores de risco cardiovascular. Em contexto de tabagismo, o estudo das CPEs demonstra algumas lacunas a nível metodológico, realçando-se o número reduzido de estudos com foco neste tema. De um modo geral, o tabaco influencia negativamente o número e função das CPEs, sendo que uma cessação tabágica, mesmo por curtos períodos de tempo, revela-se como uma medida eficaz para a redução do risco cardiovascular [70].

Relativamente ao fator atividade física, o seu papel não está ainda bem estabelecido, havendo estudos que demonstram, tanto aumento, como diminuição e manutenção do número de CPEs após atividade física. De uma forma geral, é perceptível que os diferentes resultados obtidos estão associados à conjuntura clínica e metodológica de cada estudo, pois cada estudo analisado apresentava diferentes *status* clínicos, havendo, em certos casos, avaliação em ambiente patológico, contrariamente a outros estudos realizados exclusivamente em indivíduos saudáveis. Outro fator a considerar será o exercício físico *per si*; se estamos perante uma atividade intensa ou moderada; qual a variante de exercício físico utilizada (caminhada, corrida, natação, etc) e, por último, o tempo de estudo da atividade (teste de esforço único, semanas ou meses). Deste modo, o tipo de exercício físico será determinante na resposta endotelial/vascular mediada pela medula óssea [115]. A disparidade nos resultados obtidos destaca a necessidade de mais estudos, com metodologia normalizada, a fim de se obterem resultados mais concretos. Perante a complexidade de enquadramento clínico e da metodologia instituída, torna-se previsível a variabilidade de resultados obtidos no contexto da atividade física.

No que concerne o peso corporal, verifica-se, na generalidade dos estudos analisados, que a diminuição do número de CPEs em doentes obesos é mais frequente que o seu aumento. No entanto, observa-se igualmente uma relação entre o peso corporal e a idade, onde indivi-

duos obesos adultos demonstram valores baixos de CPEs, comparativamente aos grupos controles [94, 95, 99], e crianças obesas (até aos 18 anos) apresentam um número de CPEs elevado [93, 96]. Esta discrepância pode refletir uma resposta mais acentuada na tentativa de reparação dos danos em idade juvenil, contrastando com o evidente comprometimento deste tipo de células em contexto de obesidade numa faixa etária mais avançada. Contrastando com a maioria dos resultados analisados, encontra-se o estudo de BRUYNDONCKX *et al.* [98] que determinou um número reduzido de CPEs em crianças (<18 anos) obesas, comparativamente a crianças com peso normal [98].

Relativamente ao fator idade, é notável a presença de uma relação inversa entre o número/capacidade funcional das CPEs e a idade, demonstrada por uma forte capacidade de mobilização e regeneração endotelial em idades jovens [107-109]. Todavia, verificam-se igualmente estudos que demonstram inexistência de relação causal [102, 108, 110]. Estes resultados díspares poder-se-ão dever a diferenças nos métodos da quantificação deste tipo de células ou, também, diferenças na distribuição da idade em cada estudo [116]. Por conseguinte, são necessários mais estudos de modo a estabelecerem-se relações sólidas entre as diferentes faixas etárias e respetivos impactos na função endotelial vascular das CPEs [116].

Por último, a análise do género enquanto fator de risco, demonstrou-se fracamente conclusiva, pois, na generalidade, os resultados obtidos manifestam poucas diferenças estatisticamente significativas no número de CPEs entre géneros [12, 112-114]. No entanto, FADINI *et al.* [113] e colaboradores constataram valores superiores no género feminino em recém-nascidos e idade fértil e, em contrapartida, MAIORINO *et al.* [111] demonstrou valores de CPEs superiores para o género masculino, em idades compreendidas entre os 18-30 anos. A variabilidade presente nos resultados dos estudos mencionados poder-se-á dever à inclusão de indivíduos com diferentes DCVs ou fatores de risco prévios.

É importante referir, uma vez mais, a influência do fenótipo de CPE. As divergências nos resultados dos estudos analisados referentes a cada fator de risco são fruto da escolha do fenótipo a ser incluído na pesquisa de CPs e CPEs.

Como perspetiva futura, estas células demonstram-se promissoras. LEAL *et al.* [36] refere as CPEs como importantes biomarcadores de prognóstico em síndromes coronárias agudas. O ideal seria, numa primeira fase, determinar o fenótipo específico das CPEs que melhor se correlaciona com cada fator de risco cardiovascular, para posteriormente utilizar os dados

quantitativos e qualitativos da pesquisa destas células na prática clínica, nomeadamente na monitorização de risco cardiovascular em indivíduos com maior predisposição, contribuindo para a previsão de potenciais eventos cardiovasculares.

## 8. Referências Bibliográficas

1. ARAGONA, C. O., IMBALZANO, E., MAMONE, F., CAIRO, V., LO GULLO, A., D'ASCOLA, A., SARDO, M. A., SCURUCHI, M., BASILE, G., SAITTA, A., MANDRAFFINO, G. - Endothelial progenitor cells for diagnosis and prognosis in cardiovascular disease. *Stem Cells Int.* Vol. 2016. (2016). p. 8043792.
2. 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 cells for angiogenesis. *Science.* Vol. 275. n.º 5302 (1997). p. 964-7.
3. CHONG, M. S., NG, W. K., CHAN, J. K. - Concise review: Endothelial progenitor cells in regenerative medicine: Applications and challenges. *Stem Cells Transl Med.* Vol. 5. n.º 4 (2016). p. 530-8.
4. KHOO, C. P., POZZILLI, P., ALISON, M. R. - Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications. *Regen Med.* Vol. 3. n.º 6 (2008). p. 863-76.
5. LI, D. W., LIU, Z. Q., WEI, J., LIU, Y., HU, L. S. - Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (review). *Int J Mol Med.* Vol. 30. n.º 5 (2012). p. 1000-6.
6. SCHMIDT-LUCKE, C., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., TSCHOPE, C., SCHULTHEISS, H. P., ZEIHNER, A. M., DIMMELER, S. - Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ishage protocol. *PLoS One.* Vol. 5. n.º 11 (2010). p. e13790.
7. RISAU, W. - Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* Vol. 386. n.º 6626 (1997). p. 671-4.
8. RISAU, W., FLAMME, I. - Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Vol. 11. (1995). p. 73-91.
9. CARMELIET, P. - Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* Vol. 6. n.º 4 (2000). p. 389-95.
10. PATEL-HETT, S., D'AMORE, P. A. - Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol.* Vol. 55. n.º 4-5 (2011). p. 353-63.
11. POTENTE, M., CARMELIET, P. - The link between angiogenesis and endothelial metabolism. *Annu Rev Physiol.* Vol. 79. (2017). p. 43-66.
12. TOPEL, M. L., HAYEK, S. S., KO, Y. A., SANDESARA, P. B., SAMMAN TAHHAN, A., HESAROEI, I., MAHAR, E., MARTIN, G. S., WALLER, E. K., QUYYUMI, A. A. - Sex differences in circulating progenitor cells. *J Am Heart Assoc.* Vol. 6. n.º 10 (2017).
13. ELLMARK, P., WOOLFSON, A., BELOV, L., CHRISTOPHERSON, R. I. - The applicability of a cluster of differentiation monoclonal antibody microarray to the diagnosis of human disease. *Methods Mol Biol.* Vol. 439. (2008). p. 199-209.
14. HUR, J., YOON, C. H., KIM, H. S., CHOI, J. H., KANG, H. J., HWANG, K. K., OH, B. H., LEE, M. M., PARK, Y. B. - Characterization of two types of endothelial progenitor

- cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol. 24. n.º 2 (2004). p. 288-93.
15. KEBIR, A., HARHOURI, K., GUILLET, B., LIU, J. W., FOUCAULT-BERTAUD, A., LAMY, E., KASPI, E., ELGANFOUD, N., VELY, F., SABATIER, F., SAMPOL, J., PISANO, P., KRUIHOF, E. K., BARDIN, N., DIGNAT-GEORGE, F., BLOT-CHABAUD, M. - Cd146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circ Res.* Vol. 107. n.º 1 (2010). p. 66-75.
  16. FADINI, G. P., LOSORDO, D., DIMMELER, S. - Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res.* Vol. 110. n.º 4 (2012). p. 624-37.
  17. STAUFFER, B. L., MACENEANEY, O. J., KUSHNER, E. J., CECH, J. N., GREINER, J. J., WESTBY, C. M., DESOUSA, C. A. - Gender and endothelial progenitor cell number in middle-aged adults. *Artery Res.* Vol. 2. n.º 4 (2008). p. 156-160.
  18. WOLLERT, K. C., DREXLER, H. - Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res.* Vol. 96. n.º 2 (2005). p. 151-63.
  19. GEHLING, U. M., ERGUN, S., SCHUMACHER, U., WAGENER, C., PANTEL, K., OTTE, M., SCHUCH, G., SCHAFHAUSEN, P., MENDE, T., KILIC, N., KLUGE, K., SCHAFER, B., HOSSFELD, D. K., FIEDLER, W. - In vitro differentiation of endothelial cells from ac133-positive progenitor cells. *Blood.* Vol. 95. n.º 10 (2000). p. 3106-12.
  20. YIN, A. H., MIRAGLIA, S., ZANJANI, E. D., ALMEIDA-PORADA, G., OGAWA, M., LEARY, A. G., OLWEUS, J., KEARNEY, J., BUCK, D. W. - Ac133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* Vol. 90. n.º 12 (1997). p. 5002-12.
  21. PEICHEV, M., NAIYER, A. J., PEREIRA, D., ZHU, Z., LANE, W. J., WILLIAMS, M., OZ, M. C., HICKLIN, D. J., WITTE, L., MOORE, M. A., RAFII, S. - Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* Vol. 95. n.º 3 (2000). p. 952-8.
  22. FLAMME, I., BREIER, G., RISAU, W. - Vascular endothelial growth factor (vegf) and vegf receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol.* Vol. 169. n.º 2 (1995). p. 699-712.
  23. SHIBUYA, M. - Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* Vol. 39. n.º 5 (2006). p. 469-78.
  24. ALAITI, M. A., ISHIKAWA, M., COSTA, M. A. - Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy. *Transl Res.* Vol. 156. n.º 3 (2010). p. 112-29.
  25. FRIEDRICH, E. B., WALENTA, K., SCHARLAU, J., NICKENIG, G., WERNER, N. - Cd34-/cd133+/vegfr-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* Vol. 98. n.º 3 (2006). p. e20-5.
  26. POWELL, T. M., PAUL, J. D., HILL, J. M., THOMPSON, M., BENJAMIN, M., RODRIGO, M., MCCOY, J. P., READ, E. J., KHUU, H. M., LEITMAN, S. F., FINKEL, T., CANNON, R. O., 3rd - Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial

- progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol. 25. n.º 2 (2005). p. 296-301.
27. ESPAGNOLLE, N., GUILLOTON, F., DESCHASEAUX, F., GADELORGE, M., SENSEBE, L., BOURIN, P. - Cd146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med.* Vol. 18. n.º 1 (2014). p. 104-14.
  28. BAUMANN, C. I., BAILEY, A. S., LI, W., FERKOWICZ, M. J., YODER, M. C., FLEMING, W. H. - Pecam-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood.* Vol. 104. n.º 4 (2004). p. 1010-6.
  29. FOGLE, J. E., TARIGO, J. L., THALHEIM, L., WILLIAMS, L. E., ENGLISH, L. B., SUTER, S. E. - Cd45+ and cd45- lymphocyte populations identified by flow cytometry from dogs with lymphoma exhibit similar morphology and the same clonal (b cell or t cell) lineage. *Vet Immunol Immunopathol.* Vol. 168. n.º 3-4 (2015). p. 242-8.
  30. REHMAN, J., LI, J., ORSCHELL, C. M., MARCH, K. L. - Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* Vol. 107. n.º 8 (2003). p. 1164-9.
  31. SHIM, Y., NAM, M. H., HYUK, S. W., YOON, S. Y., SONG, J. M. - Concurrent hypermulticolor monitoring of cd31, cd34, cd45 and cd146 endothelial progenitor cell markers for acute myocardial infarction. *Anal Chim Acta.* Vol. 853. (2015). p. 501-507.
  32. ANTONIO, N., FERNANDES, R., SOARES, A., SOARES, F., LOPES, A., CARVALHEIRO, T., PAIVA, A., PEGO, G. M., PROVIDENCIA, L. A., GONCALVES, L., RIBEIRO, C. F. - Reduced levels of circulating endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction patients with diabetes or pre-diabetes: Accompanying the glycemic continuum. *Cardiovasc Diabetol.* Vol. 13. (2014). p. 101.
  33. HIRSCHI, K. K., INGRAM, D. A., YODER, M. C. - Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol. 28. n.º 9 (2008). p. 1584-95.
  34. YODER, M. C. - Endothelial progenitor cell: A blood cell by many other names may serve similar functions. *J Mol Med (Berl).* Vol. 91. n.º 3 (2013). p. 285-95.
  35. HRISTOV, M., ERL, W., WEBER, P. C. - Endothelial progenitor cells: Mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol. 23. n.º 7 (2003). p. 1185-9.
  36. LEAL, V., RIBEIRO, C. F., OLIVEIROS, B., ANTONIO, N., SILVA, S. - Intrinsic vascular repair by endothelial progenitor cells in acute coronary syndromes: An update overview. *Stem Cell Rev.* Vol. 15. n.º 1 (2019). p. 35-47.
  37. CHAO, H., HIRSCHI, K. K. - Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvasc Res.* Vol. 79. n.º 3 (2010). p. 169-73.
  38. YODER, M. C. - Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* Vol. 2. n.º 7 (2012). p. a006692.

39. ESTES, M. L., MUND, J. A., MEAD, L. E., PRATER, D. N., CAI, S., WANG, H., POLLOK, K. E., MURPHY, M. P., AN, C. S., SROUR, E. F., INGRAM, D. A., Jr., CASE, J. - Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytometry A*. Vol. 77. n.° 9 (2010). p. 831-9.
40. FADINI, G. P., CORACINA, A., BAESSO, I., AGOSTINI, C., TIENGO, A., AVOGARO, A., DE KREUTZENBERG, S. V. - Peripheral blood cd34+kdr+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke*. Vol. 37. n.° 9 (2006). p. 2277-82.
41. FADINI, G. P., BAESSO, I., ALBIERO, M., SARTORE, S., AGOSTINI, C., AVOGARO, A. - Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau. *Atherosclerosis*. Vol. 197. n.° 2 (2008). p. 496-503.
42. GROSS, A., SCHOENDUBE, J., ZIMMERMANN, S., STEEB, M., ZENGERLE, R., KOLTAY, P. - Technologies for single-cell isolation. *Int J Mol Sci*. Vol. 16. n.° 8 (2015). p. 16897-919.
43. KHAN, S. S., SOLOMON, M. A., MCCOY, J. P., Jr. - Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. Vol. 64. n.° 1 (2005). p. 1-8.
44. SIRKER, A. A., ASTROULAKIS, Z. M., HILL, J. M. - Vascular progenitor cells and translational research: The role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodelling in the adult. *Clin Sci (Lond)*. Vol. 116. n.° 4 (2009). p. 283-99.
45. LIN, L. Y., HUANG, C. C., CHEN, J. S., WU, T. C., LEU, H. B., HUANG, P. H., CHANG, T. T., LIN, S. J., CHEN, J. W. - Effects of pitavastatin versus atorvastatin on the peripheral endothelial progenitor cells and vascular endothelial growth factor in high-risk patients: A pilot prospective, double-blind, randomized study. *Cardiovasc Diabetol*. Vol. 13. (2014). p. 111.
46. LEKAKIS, J., ABRAHAM, P., BALBARINI, A., BLANN, A., BOULANGER, C. M., COCKCROFT, J., COSENTINO, F., DEANFIELD, J., GALLINO, A., IKONOMIDIS, I., KREMASTINOS, D., LANDMESSER, U., PROTOGEROU, A., STEFANADIS, C., TOUSOULIS, D., VASSALLI, G., VINK, H., WERNER, N., WILKINSON, I., VLACHOPOULOS, C. - Methods for evaluating endothelial function: A position statement from the european society of cardiology working group on peripheral circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. Vol. 18. n.° 6 (2011). p. 775-89.
47. WU, Y. T., LI, J. X., LIU, S., XIN, Y., WANG, Z. J., GAO, J., JI, B. Y., FAN, X. M., ZHOU, Q. W. - A novel and feasible way to cultivate and purify endothelial progenitor cells from bone marrow of children with congenital heart diseases. *Chin Med J (Engl)*. Vol. 125. n.° 11 (2012). p. 1903-7.
48. HILL, J. M., ZALOS, G., HALCOX, J. P., SCHENKE, W. H., WACLAWIW, M. A., QUYYUMI, A. A., FINKEL, T. - Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. Vol. 348. n.° 7 (2003). p. 593-600.
49. MAUGE, L., SABATIER, F., BOUTOUYRIE, P., D'AUDIGIER, C., PEYRARD, S., BOZEC, E., BLANCHARD, A., AZIZI, M., DIZIER, B., DIGNAT-GEORGE, F.,

- GAUSSEM, P., SMADJA, D. M. - Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy*. Vol. 16. n.º 2 (2014). p. 213-24.
50. SHANTSILA, E., WATSON, T., TSE, H. F., LIP, G. Y. - Endothelial colony forming units: Are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers? *Ann Med*. Vol. 39. n.º 6 (2007). p. 474-9.
51. IMANISHI, T., TSUJIOKA, H., AKASAKA, T. - Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: Contribution to oxidative stress. *Curr Cardiol Rev*. Vol. 4. n.º 4 (2008). p. 275-86.
52. ROSENZWEIG, A. - Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med*. Vol. 348. n.º 7 (2003). p. 581-2.
53. 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 marrow niche requires mmp-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. Vol. 109. n.º 5 (2002). p. 625-37.
54. DAR, A., KOLLET, O., LAPIDOT, T. - Mutual, reciprocal sdf-1/cxcr4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in nod/scid chimeric mice. *Exp Hematol*. Vol. 34. n.º 8 (2006). p. 967-75.
55. AICHER, A., ZEIHNER, A. M., DIMMELER, S. - Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. Vol. 45. n.º 3 (2005). p. 321-5.
56. HUANG, P. H., CHEN, Y. H., WANG, C. H., CHEN, J. S., TSAI, H. Y., LIN, F. Y., LO, W. Y., WU, T. C., SATA, M., CHEN, J. W., LIN, S. J. - Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Vol. 29. n.º 8 (2009). p. 1179-84.
57. PETIT, I., JIN, D., RAFII, S. - The sdf-1-cxcr4 signaling pathway: A molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*. Vol. 28. n.º 7 (2007). p. 299-307.
58. BRIASOULIS, A., TOUSOULIS, D., ANTONIADES, C., PAPAGEORGIOU, N., STEFANADIS, C. - The role of endothelial progenitor cells in vascular repair after arterial injury and atherosclerotic plaque development. *Cardiovasc Ther*. Vol. 29. n.º 2 (2011). p. 125-39.
59. LAPIDOT, T., PETIT, I. - Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. Vol. 30. n.º 9 (2002). p. 973-81.
60. SHINTANI, S., MUROHARA, T., IKEDA, H., UENO, T., HONMA, T., KATOH, A., SASAKI, K., SHIMADA, T., OIKE, Y., IMAIZUMI, T. - Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. Vol. 103. n.º 23 (2001). p. 2776-9.
61. TAKAHASHI, T., KALKA, C., MASUDA, H., CHEN, D., SILVER, M., KEARNEY, M., MAGNER, M., ISNER, J. M., ASAHARA, T. - Ischemia- and cytokine-induced

- mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. Vol. 5. n.° 4 (1999). p. 434-8.
62. ASAHARA, T., TAKAHASHI, T., MASUDA, H., KALKA, C., CHEN, D., IWAGURO, H., INAI, Y., SILVER, M., ISNER, J. M. - Vegf contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo j*. Vol. 18. n.° 14 (1999). p. 3964-72.
  63. CERADINI, D. J., KULKARNI, A. R., CALLAGHAN, M. J., TEPPER, O. M., BASTIDAS, N., KLEINMAN, M. E., CAPLA, J. M., GALIANO, R. D., LEVINE, J. P., GURTNER, G. C. - Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through hif-1 induction of sdf-1. *Nat Med*. Vol. 10. n.° 8 (2004). p. 858-64.
  64. DE FALCO, E., PORCELLI, D., TORELLA, A. R., STRAINO, S., IACHININOTO, M. G., ORLANDI, A., TRUFFA, S., BIGLIOLI, P., NAPOLITANO, M., CAPOGROSSI, M. C., PESCE, M. - Sdf-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood*. Vol. 104. n.° 12 (2004). p. 3472-82.
  65. KROCK, B. L., SKULI, N., SIMON, M. C. - Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes Cancer*. Vol. 2. n.° 12 (2011). p. 1117-33.
  66. GILL, M., DIAS, S., HATTORI, K., RIVERA, M. L., HICKLIN, D., WITTE, L., GIRARDI, L., YURT, R., HIMEL, H., RAFII, S. - Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of vegfr2(+)/ac133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. Vol. 88. n.° 2 (2001). p. 167-74.
  67. TILLING, L., CHOWIENCZYK, P., CLAPP, B. - Progenitors in motion: Mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*. Vol. 68. n.° 4 (2009). p. 484-92.
  68. FRID, M. G., KALE, V. A., STENMARK, K. R. - Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: In vitro analysis. *Circ Res*. Vol. 90. n.° 11 (2002). p. 1189-96.
  69. SAHA, S. P., BHALLA, D. K., WHAYNE, T. F., Jr., GAIROLA, C. - Cigarette smoke and adverse health effects: An overview of research trends and future needs. *Int J Angiol*. Vol. 16. n.° 3 (2007). p. 77-83.
  70. KONDO, T., HAYASHI, M., TAKESHITA, K., NUMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, K., IINO, S., INDEN, Y., MUROHARA, T. - Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Vol. 24. n.° 8 (2004). p. 1442-7.
  71. PULS, M., SCHROETER, M. R., STEIER, J., STIJOHANN, L., HASENFUSS, G., KONSTANTINIDES, S., SCHAFFER, K. - Effect of smoking cessation on the number and adhesive properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol*. Vol. 152. n.° 1 (2011). p. 61-9.
  72. LAMIRAULT, G., SUSEN, S., FOREST, V., HEMONT, C., PARINI, A., LE CORVOISIER, P., PIOT, C., RICHARD, M. J., DELASALLE, B., ROUARD, H., SPORTOUCH, C., PERSOONS, V., VAN BELLE, E., RONCALLI, J., LEMARCHAND, P. - Difference in mobilization of progenitor cells after myocardial infarction in smoking versus non-

- smoking patients: Insights from the bonami trial. *Stem Cell Res Ther.* Vol. 4. n.° 6 (2013). p. 152.
73. DI STEFANO, R., BARSOTTI, M. C., FELICE, F., MAGERA, A., LEKAKIS, J., LEONE, A., BALBARINI, A. - Smoking and endothelial progenitor cells: A revision of literature. *Curr Pharm Des.* Vol. 16. n.° 23 (2010). p. 2559-66.
  74. UMEMURA, T., HIGASHI, Y. - Endothelial progenitor cells: Therapeutic target for cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci.* Vol. 108. n.° 1 (2008). p. 1-6.
  75. YOSHIDA, O., KONDO, T., KUREISHI-BANDO, Y., SUGIURA, T., MAEDA, K., OKUMURA, K., MUROHARA, T. - Pitavastatin, an hmg-coa reductase inhibitor, ameliorates endothelial function in chronic smokers. *Circ J.* Vol. 74. n.° 1 (2010). p. 195-202.
  76. SHISHEHBOR, M. H., BRENNAN, M. L., AVILES, R. J., FU, X., PENN, M. S., SPRECHER, D. L., HAZEN, S. L. - Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation.* Vol. 108. n.° 4 (2003). p. 426-31.
  77. YAMADA, T., NODE, K., MINE, T., MORITA, T., KIOKA, H., TSUKAMOTO, Y., TAMAKI, S., MASUDA, M., OKUDA, K., FUKUNAMI, M. - Long-term effect of atorvastatin on neurohumoral activation and cardiac function in patients with chronic heart failure: A prospective randomized controlled study. *Am Heart J.* Vol. 153. n.° 6 (2007). p. 1055.e1-8.
  78. VEGA, R. B., KONHILAS, J. P., KELLY, D. P., LEINWAND, L. A. - Molecular mechanisms underlying cardiac adaptation to exercise. *Cell Metab.* Vol. 25. n.° 5 (2017). p. 1012-1026.
  79. PINCKARD, K., BASKIN, K. K., STANFORD, K. I. - Effects of exercise to improve cardiovascular health. *Front Cardiovasc Med.* Vol. 6. (2019). p. 69.
  80. EVERAERT, B. R., VAN CRAENENBROECK, E. M., HOYMANS, V. Y., HAINE, S. E., VAN NASSAUW, L., CONRAADS, V. M., TIMMERMANS, J. P., VRINTS, C. J. - Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: Focus on pi3k/akt/enos pathway. *Int J Cardiol.* Vol. 144. n.° 3 (2010). p. 350-66.
  81. BRUYNDONCKX, L., HOYMANS, V. Y., DE GUCHTENAERE, A., VAN HELVOIRT, M., VAN CRAENENBROECK, E. M., FREDERIX, G., LEMMENS, K., VISSERS, D. K., VRINTS, C. J., RAMET, J., CONRAADS, V. M. - Diet, exercise, and endothelial function in obese adolescents. *Pediatrics.* Vol. 135. n.° 3 (2015). p. e653-61.
  82. VAN CRAENENBROECK, E. M., BRUYNDONCKX, L., VAN BERCKELAER, C., HOYMANS, V. Y., VRINTS, C. J., CONRAADS, V. M. - The effect of acute exercise on endothelial progenitor cells is attenuated in chronic heart failure. *Eur J Appl Physiol.* Vol. 111. n.° 9 (2011). p. 2375-9.
  83. PITHA, J., KRALOVA LESNA, I., STAVEK, P., MAHROVA, A., RACEK, J., SEKERKOVA, A., TEPLAN, V., STOLLOVA, M. - Effect of exercise on markers of vascular health in renal transplant recipients. *Physiol Res.* Vol. 64. n.° 6 (2015). p. 945-9.

84. RIEGERSPERGER, M., PLISCHKE, M., STEINER, S., SEIDINGER, D., SENGOELGE, G., WINKELMAYER, W. C., SUNDER-PLASSMANN, G. - Effect of conversion from ciclosporin to tacrolimus on endothelial progenitor cells in stable long-term kidney transplant recipients. *Transplantation*. Vol. 95. n.º 11 (2013). p. 1338-45.
85. VALGIMIGLI, M., RIGOLIN, G. M., FUCILI, A., PORTA, M. D., SOUKHOMOVSKAIA, O., MALAGUTTI, P., BUGLI, A. M., BRAGOTTI, L. Z., FRANCOLINI, G., MAURO, E., CASTOLDI, G., FERRARI, R. - Cd34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*. Vol. 110. n.º 10 (2004). p. 1209-12.
86. VAN CRAENENBROECK, E. M., VRINTS, C. J., HAINE, S. E., VERMEULEN, K., GOOVAERTS, I., VAN TENDELOO, V. F., HOYMANS, V. Y., CONRAADS, V. M. - A maximal exercise bout increases the number of circulating cd34+/kdr+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol* (1985). Vol. 104. n.º 4 (2008). p. 1006-13.
87. LIPPINCOTT, M. F., DESAI, A., ZALOS, G., CARLOW, A., DE JESUS, J., BLUM, A., SMITH, K., RODRIGO, M., PATIBANDLA, S., CHAUDHRY, H., GLASER, A. P., SCHENKE, W. H., CSAKO, G., WACLAWIWI, M. A., CANNON, R. O., 3rd - Predictors of endothelial function in employees with sedentary occupations in a worksite exercise program. *Am J Cardiol*. Vol. 102. n.º 7 (2008). p. 820-4.
88. CASSIDY, A. E., BIELAK, L. F., ZHOU, Y., SHEEDY, P. F., 2nd, TURNER, S. T., BREEN, J. F., ARAOZ, P. A., KULLO, I. J., LIN, X., PEYSER, P. A. - Progression of subclinical coronary atherosclerosis: Does obesity make a difference? *Circulation*. Vol. 111. n.º 15 (2005). p. 1877-82.
89. WOLK, R., BERGER, P., LENNON, R. J., BRILAKIS, E. S., SOMERS, V. K. - Body mass index: A risk factor for unstable angina and myocardial infarction in patients with angiographically confirmed coronary artery disease. *Circulation*. Vol. 108. n.º 18 (2003). p. 2206-11.
90. YUSUF, S., HAWKEN, S., OUNPUU, S., BAUTISTA, L., FRANZOSI, M. G., COMMERFORD, P., LANG, C. C., RUMBOLDT, Z., ONEN, C. L., LISHENG, L., TANOMSUP, S., WANGAI, P., Jr., RAZAK, F., SHARMA, A. M., ANAND, S. S. - Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: A case-control study. *Lancet*. Vol. 366. n.º 9497 (2005). p. 1640-9.
91. GRUNDY, S. M., BREWER, H. B., Jr., CLEEMAN, J. I., SMITH, S. C., Jr., LENFANT, C. - Definition of metabolic syndrome: Report of the national heart, lung, and blood institute/american heart association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. Vol. 109. n.º 3 (2004). p. 433-8.
92. BERG, A. H., SCHERER, P. E. - Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. Vol. 96. n.º 9 (2005). p. 939-49.
93. PIRES, A., MARTINS, P., PAIVA, A., PEREIRA, A. M., MARQUES, M., CASTELA, E., SENA, C., SEICA, R. - Circulating endothelial progenitor cells in obese children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. Vol. 91. n.º 6 (2015). p. 560-6.

94. HEIDA, N. M., MULLER, J. P., CHENG, I. F., LEIFHEIT-NESTLER, M., FAUSTIN, V., RIGGERT, J., HASENFUSS, G., KONSTANTINIDES, S., SCHAFER, K. - Effects of obesity and weight loss on the functional properties of early outgrowth endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*. Vol. 55. n.° 4 (2010). p. 357-67.
95. MACENEANEY, O. J., KUSHNER, E. J., VAN GUILDER, G. P., GREINER, J. J., STAUFFER, B. L., DESOUZA, C. A. - Endothelial progenitor cell number and colony-forming capacity in overweight and obese adults. *Int J Obes (Lond)*. Vol. 33. n.° 2 (2009). p. 219-25.
96. JUNG, C., FISCHER, N., FRITZENWANGER, M., THUDE, H., FERRARI, M., FABRIS, M., BREHM, B. R., BARZ, D., FIGULLA, H. R. - Endothelial progenitor cells in adolescents: Impact of overweight, age, smoking, sport and cytokines in younger age. *Clin Res Cardiol*. Vol. 98. n.° 3 (2009). p. 179-88.
97. WESTERWEEL, P. E., VISSEREN, F. L., HAJER, G. R., OLIJHOEK, J. K., HOEFER, I. E., DE BREE, P., RAFII, S., DOEVENDANS, P. A., VERHAAR, M. C. - Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. Simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur Heart J*. Vol. 29. n.° 22 (2008). p. 2808-17.
98. BRUYNDONCKX, L., HOYMANS, V. Y., FREDERIX, G., DE GUCHTENAERE, A., FRANCKX, H., VISSERS, D. K., VRINTS, C. J., RAMET, J., CONRAADS, V. M. - Endothelial progenitor cells and endothelial microparticles are independent predictors of endothelial function. *J Pediatr*. Vol. 165. n.° 2 (2014). p. 300-5.
99. MULLER-EHMSEN, J., BRAUN, D., SCHNEIDER, T., PFISTER, R., WORM, N., WIELCKENS, K., SCHEID, C., FROMMOLT, P., FLESCH, M. - Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: Beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J*. Vol. 29. n.° 12 (2008). p. 1560-8.
100. DHINGRA, R., VASAN, R. S. - Age as a risk factor. *Med Clin North Am*. Vol. 96. n.° 1 (2012). p. 87-91.
101. PHILLIP, J. M., AIFUWA, I., WALSTON, J., WIRTZ, D. - The mechanobiology of aging. *Annu Rev Biomed Eng*. Vol. 17. (2015). p. 113-141.
102. CAZEAU, R. M., HUANG, H., BAUER, J. A., HOFFMAN, R. P. - Effect of vitamins c and e on endothelial function in type I diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. Vol. 2016. (2016). p. 3271293.
103. CAI, H., HARRISON, D. G. - Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res*. Vol. 87. n.° 10 (2000). p. 840-4.
104. STEHOUWER, C. D., LAMBERT, J., DONKER, A. J., VAN HINSBERGH, V. W. - Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*. Vol. 34. n.° 1 (1997). p. 55-68.
105. VARVAROVSKA, J., RACEK, J., STETINA, R., SYKORA, J., POMAHACOVA, R., RUSAVY, Z., LACIGOVA, S., TREFIL, L., SIALA, K., STOZICKY, F. - Aspects of oxidative stress in children with type I diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. Vol. 58. n.° 10 (2004). p. 539-45.

106. WITTENSTEIN, B., KLEIN, M., FINCKH, B., ULLRICH, K., KOHLSCHUTTER, A. - Plasma antioxidants in pediatric patients with glycogen storage disease, diabetes mellitus, and hypercholesterolemia. *Free Radic Biol Med.* Vol. 33. n.° 1 (2002). p. 103-10.
107. JIE, K. E., GOOSSENS, M. H., VAN OOSTROM, O., LILIEN, M. R., VERHAAR, M. C. - Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis.* Vol. 202. n.° 2 (2009). p. 345-7.
108. HEISS, C., KEYMEL, S., NIESLER, U., ZIEMANN, J., KELM, M., KALKA, C. - Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* Vol. 45. n.° 9 (2005). p. 1441-8.
109. UMEMURA, T., SOGA, J., HIDAKA, T., TAKEMOTO, H., NAKAMURA, S., JITSUIKI, D., NISHIOKA, K., GOTO, C., TERAGAWA, H., YOSHIKUNI, M., CHAYAMA, K., HIGASHI, Y. - Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *Am J Hypertens.* Vol. 21. n.° 11 (2008). p. 1203-9.
110. CHEN, M. C., YIP, H. K., CHEN, C. J., YANG, C. H., WU, C. J., CHENG, C. I., CHEN, Y. H., CHAI, H. T., LEE, C. P., CHANG, H. W. - No age-related change in circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Int Heart J.* Vol. 47. n.° 1 (2006). p. 95-105.
111. MAIORINO, M. I., BELLASTELLA, G., CASCIANO, O., PETRIZZO, M., GICCHINO, M., CAPUTO, M., SARNATARO, A., GIUGLIANO, D., ESPOSITO, K. - Gender-differences in glycemic control and diabetes related factors in young adults with type 1 diabetes: Results from the metro study. *Endocrine.* Vol. 61. n.° 2 (2018). p. 240-247.
112. ROSSI, F., BERTONE, C., MONTANILE, F., MIGLIETTA, F., LUBRANO, C., GANDINI, L., SANTIEMMA, V. - Hdl cholesterol is a strong determinant of endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic subjects. *Microvasc Res.* Vol. 80. n.° 2 (2010). p. 274-9.
113. FADINI, G. P., DE KREUTZENBERG, S., ALBIERO, M., CORACINA, A., PAGNIN, E., BAESSO, I., CIGNARELLA, A., BOLEGO, C., PLEBANI, M., NARDELLI, G. B., SARTORE, S., AGOSTINI, C., AVOGARO, A. - Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: The role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Vol. 28. n.° 5 (2008). p. 997-1004.
114. ARNOLD, C., WENTA, D., MULLER-EHMSSEN, J., SREERAM, N., GRAF, C. - Progenitor cell number is correlated to physical performance in obese children and young adolescents. *Cardiol Young.* Vol. 20. n.° 4 (2010). p. 381-6.
115. NIEDERSEER, D., STEIDLE-KLOC, E., MAYR, M., MULLER, E. E., CADAMURO, J., PATSCH, W., DELA, F., MULLER, E., NIEBAUER, J. - Effects of a 12-week alpine skiing intervention on endothelial progenitor cells, peripheral arterial tone and endothelial biomarkers in the elderly. *Int J Cardiol.* Vol. 214. (2016). p. 343-7.
116. THIJSSSEN, D. H., TORELLA, D., HOPMAN, M. T., ELLISON, G. M. - The role of endothelial progenitor and cardiac stem cells in the cardiovascular adaptations to age and exercise. *Front Biosci (Landmark Ed).* Vol. 14. (2009). p. 4685-702.