

**Níveis de Diferentes Linhagens de Células
Progenitoras Circulantes e da Função Vascular
em Atletas de *Endurance***

Rebeca Caldeira Machado

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)

**Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Março de 2011

Níveis de Diferentes Linhagens de Células Progenitoras Circulantes e da Função Vascular em Atletas de *Endurance*

Rebeca Caldeira Machado

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em: 22/03/2011

Prof. Dr. José Gerado Mill – Orientador/UFES

Prof. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles - PPGCF/UFES

Prof. Dra. Nance Beyer Nardi - ULBRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Março de 2011

Machado, Rebeca, 1985

Avaliação dos níveis de diferentes linhagens de células progenitoras circulantes em atletas de *endurance*. [Vitória] 2011

XIV, 102p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2011)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Mill

1. EPC 2. Treinamento aeróbico 3. Função endotelial 4. DMF braquial

“A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento.”
Provérbios 4:7.

AGRADECIMENTOS

Se houvesse a necessidade de agradecer individual e detalhadamente a cada um que contribuiu não somente para realização deste trabalho, mas também para minha formação nesses dois anos, seria necessário escrever, sem exageros, o equivalente à outra dissertação. Tão grande é minha gratidão a todos que estiveram comigo, mesmo em pequenos gestos e momentos, mas que foram de enorme importância para mim até aqui.

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus que me concedeu vida, grandes oportunidades e tornou todas as coisas possíveis em meu caminho conforme o Seu poder e onipotência. “Ora, Àquele que é poderoso para fazer tudo muito mais abundantemente além daquilo que pedimos ou pensamos, segundo o poder que em nós opera, a esse glória na igreja, por Jesus Cristo, em todas as gerações, para todo o sempre, Amém” Efésios 3 : 20,21.

Aos meus pais e irmã, que estavam sempre presentes me apoiando e incentivando nos momentos difíceis. Aos tios, primos, avó e amigos pelas orações e por torcerem pelo meu sucesso. E claro, ao Hermano que nos momentos finais desse trabalho esteve presente em oração e sempre com uma palavra de ânimo e conforto que foram de enorme importância para conclusão do mesmo.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular. Agradeço em especial ao professor José Geraldo Mill por me abrir as portas de seu laboratório me concedendo todo recurso e instrução necessários para minha formação profissional. Ao Marcelo e a Ludimila, que não só foram companheiros até aqui e me ajudaram de diversas formas, mas se tornaram meus grandes amigos. Ao Dr. Leonard pela paciência e horas dedicadas em cada exame de imagem realizado. Ao Eduardo, pelas instruções em estatística. Aos demais integrantes desse grupo: Enildo, Divanei, Luciana, Wellington, Marcela, Diana, Sérgio e Viviane pelos momentos de conhecimento compartilhados e também de entretenimento, especialmente em nossas confraternizações.

Aos colegas do laboratório de eletromecânica cardíaca: Jonaína, Bruna, Maylla e Thaís. Aos professores Inavita Stefanon e Dalton Vassalo. Cada um, de uma forma particular, contribuiu em minha jornada até aqui.

Aos colegas da Clínica de Investigação Cardiovascular Elis, Adriana e Yara pela amizade, companheirismo, e sempre dispostas a ajudar no que fosse preciso. À Carla pelos “cafezinhos” e momentos de entretenimento e ao Rodrigo pelo auxílio na organização do banco de dados do projeto ESCHOT.

À equipe do Criobanco – Ciência e Tecnologia, Dr. Edgar, Bruno, André e Silvania por disponibilizarem o citômetro de fluxo, me “tolerarem” todos esses meses de aquisição de dados, e pelas orientações e ensinamentos valiosíssimos. Especialmente, agradeço ao Bruno sempre presente e disposto a ajudar.

Às colegas do Núcleo de Doenças Infecciosas, Flávia e Ana Carolina, sempre prestativas para tirar minhas numerosas dúvidas em citometria de fluxo. Ao professor Rodrigo pelo espaço concedido em seu laboratório, orientações dadas e oportunidade de aprender a técnica.

Aos outros colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, professores, técnicos, equipe da secretaria, da limpeza, e dos laboratórios pelas diversas horas divididas.

À Dra. Nance Beyer Nardi e à Dra. Paula Vassalo, que mesmo distantes, eram sempre prestativas e dispostas a me ajudar, esclarecendo prontamente todos os questionamentos relacionados à padronização do protocolo de citometria de fluxo.

Às agências de fomento, CNPq, Fapes e CAPES.

RESUMO

Introdução: Recentes evidências mostram que a função vascular não depende somente de células residentes na parede do vaso, mas ainda, parece ser significativamente modulada por células circulantes derivadas da medula óssea. O treinamento físico induz a mobilização de Células Progenitoras Endoteliais (EPCs) e possui efeitos benéficos sobre a função endotelial na presença de doença vascular estabelecida e/ou de fatores de risco cardiovascular. Entretanto, tais efeitos em indivíduos saudáveis ainda são pouco conhecidos. **Objetivos:** Avaliar os níveis de CPCs, EPCs e a função endotelial de homens saudáveis, praticantes de corrida de longa duração, e em sedentários saudáveis. **Métodos:** Praticantes corridas aeróbicas de longa duração (Grupo TA, n= 38, >40 km/semana, há mais de 2 anos com velocidade ≥ 15 km/h), com idade entre 21– 58 anos, foram orientados a não praticarem exercício nas 24 horas antes da coleta de sangue. Indivíduos sedentários saudáveis (Grupo CT, n= 30) foram incluídos como controle. Todos, participantes do Estudo ESCHOT. Células CD34⁺, CD133⁺ e subpopulações CD34⁺CD133⁺ (CPCs), e CD34⁺KDR⁺ (EPCs) foram quantificadas por citometria de fluxo em sangue periférico total. a função endotelial foi avaliada por dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial por meio de imagem de ultrassom de alta resolução. Os dados não normalmente distribuídos foram analisados por teste de Mann Whitney U e coeficiente de correlação de Spearman (r), expressos como a mediana \pm erro padrão da média. Os dados com distribuição normal foram analisados por Teste T e coeficiente de correlação de Pearson, expressos como média \pm erro padrão da média. O valor de $p < 0,05$ considerado significativo. **Resultados:** Não houve diferença estatística entre os grupos na contagem de CPCs (CT: CD34⁺: $0,0381 \pm 0,0036$; CD133⁺: $0,0308 \pm 0,0043$; CD34⁺/CD133⁺: $0,0149 \pm 0,0024$. TA: CD34⁺: $0,0399 \pm 0,0050$; CD133⁺: $0,0199 \pm 0,0052$; CD34⁺/CD133⁺: $0,0124 \pm 0,0033$). Foram observados maiores níveis de EPCs no grupo TA (CD34⁺KDR⁺: $0,0121 \pm 0,0025$) em relação ao grupo CT ($0,0083 \pm 0,0012$) com uma tendência à significância estatística ($p = 0,057$). A %DMF no grupo TA ($8,71 \pm 0,59$) foi similar ao CT ($7,61 \pm 0,59$) e não teve correlação com o número de EPCs. **Conclusão:** Dentre as populações celulares avaliadas, apenas os níveis

de EPCs foram maiores no grupo TA em relação ao grupo CT, o que não foi correlacionou-se com melhora da função endotelial. Tal achado poderia estar associado à população estudada ser de indivíduos saudáveis, sem a presença de fatores associados à disfunção endotelial.

Palavras-chave: EPC; treinamento aeróbico; função endotelial; DMF braquial

ABSTRACT

Background. Recent evidence has shown that vascular function depends not only resident cells in the vessel wall but also appears to be significantly modulated by circulating cells derived from bone marrow. The physical training induces endothelial progenitor cells (EPCs) mobilization and has beneficial effects on endothelial function in the presence of vascular disease or cardiovascular risk factors. However, this effects in healthy individuals is still little known. **Aims:** Assess CPCs, EPCs levels and endothelial function in healthy male runners are long-term and healthy sedentary. **Methods:** Long-term runners (TA group, n= 38, >40km/week, For over two years with speed \geq 15km/h), aged 21 to 58 years, were instructed not to do exercise for 24 hours before collection blood. Healthy sedentary subjects were included as controls (CT group, n= 30). All were participants in the ESCHOT study. CD34⁺, CD133⁺ cells and CD34⁺CD133⁺ subpopulations (CPCs), CD34⁺KDR⁺ (EPCs) were quantified by flow cytometry on total peripheral blood. The endothelial function was assessed by flow-mediated dilatation (FMD) of brachial artery using high resolution vascular ultrasound. Data not normally distributed were analyzed by testing Mann Whitney U and Spearman's correlation coefficient (r), expressed an median \pm standard error of mean. Data with normal distribution were analyzed by T test and Pearson's correlation coefficient, expressed as mean \pm standard error of mean. The p value < 0,05 was considered significant. **Results:** There were no statistical difference between groups in the count of CPCs. (CT: CD34⁺: 0,0381 \pm 0,0036; CD133⁺: 0,0308 \pm 0,0043; CD34⁺/CD133⁺: 0,0149 \pm 0,0024. TA: CD34⁺: 0,0399 \pm 0,0050; CD133⁺: 0,0199 \pm 0,0052; CD34⁺/CD133⁺: 0,0124 \pm 0,0033). Showed higher levels of EPCs in the TA group (CD34⁺KDR⁺: 0,0121 \pm 0,0025) compared to CT group (0,0083 \pm 0,0012) with a trend towards statistical significance (p = 0,057). The% FMD in the TA group (8.71 \pm 0.59) was similar to CT (7.61 \pm 0.59) and did not correlate with the number of EPCs.**Conclusion:** Among the populations evaluated, only the levels of EPCs were higher in TA compared to CT, which was not correlated with improved endothelial function. This finding may be associated with the

studied population be of healthy individuals without the presence of factors associated with endothelial dysfunction.

Key words: EPC; aerobic training; endothelial function, brachial FMD

LISTA DE ABREVIATURAS

DAC	Doença arterial coronariana
CIC	Clínica de investigação cardiovascular
CK	Creatina quinase
CK-MB	Creatina quinase MB
CMN	Células mononucleares
CPCs	<i>Circulating progenitor cells</i>
CT	Grupo controle
Cu/Zn-SOD	<i>Cu/Zn- superoxide dismutase</i>
DMF	Dilatação mediada por fluxo
EcSOD	<i>Extracellular superoxide dismutase</i>
EDHF	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EPCs	<i>Endothelial progenitor cells</i>
EPM	Erro padrão da média
ET1	Endotelina 1
FGF-1	<i>Fibroblast growth factor 1</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GC	Guanilato ciclase
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HPCs	<i>Hematopoietic progenitor cells</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IMC	Índice de massa corporal
Mn-SOD	<i>Mn-superoxide dismutase</i>
NAD(P)H	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NO	Oxido nítrico
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PGH ₂	Prostaglandina H ₂

PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PKG	<i>Protein Kinase G</i>
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
TA	Grupo de treinamento aeróbico
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i>
TR	Grupo de treinamento resistido
TXA ₂	Tromboxano A ₂
VEGF-R2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
VO _{2máx}	Volume de oxigênio máximo
VOP	Velocidade de onda de pulso

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Função Endotelial	16
1.2 Disfunção Endotelial	18
1.3 Sistema Cardiovascular e o Exercício Físico	22
1.4 Função Endotelial e o Exercício Físico	23
1.5 Exercício Físico e Angiogênese	28
1.6 Células Progenitoras Endoteliais (EPCs)	29
1.7 Exercício Físico e EPCs	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Delineamento e Seleção da Amostra do Estudo ESCHOT	38
3.2 Orientações ao Participante para Ida à CIC	40
3.3 Realização dos Testes, Medidas e Exames	41
3.3.1 TESTE DE DILATAÇÃO MEDIADA POR FLUXO DA ARTÉRIA BRAQUIAL	42
3.3.2 COLETA DE SANGUE	45
3.4 Quantificação de EPCs e CPCs por Citometria de Fluxo	45
3.5 Análise dos Dados de Imunofenotipagem de EPCs e CPCs	47
3.6 Análise Estatística	49
4. RESULTADOS	50
4.1 Características da Amostra	51
4.2 Parâmetros Enzimáticos	52
4.3 Distribuição da Variável: Contagem Celular	54

4.4 Teste de Reprodutibilidade entre Ensaios	59
4.5 Células Progenitoras Circulantes	59
4.6 Dilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial.	63
5. DISCUSSÃO	67
5.1 Principais Achados	69
5.2 Parâmetros Bioquímicos	69
5.3 Células Progenitoras Circulantes	71
5.4 Dilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial	74
5.5 Células Progenitoras Endoteliais e Dilatação Mediada por Fluxo	76
6. CONCLUSÃO	78
7. REFERÊNCIAS	80

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Função Endotelial

O endotélio é uma camada única de células que reveste a superfície luminal dos vasos sanguíneos. Este órgão pesa cerca de um quilograma (1kg) e é composto por $1-6 \times 10^{13}$ células (Augustin et al., 1994). Desde os experimentos pioneiros de Furchgott e Zawadzki (1980) em que descreveram sua original observação sobre o fator relaxante derivado do endotélio, hoje identificado como óxido nítrico (NO), tem-se o conhecimento que o endotélio modula ativamente o tônus vascular, sendo esta uma molécula chave na regulação de várias funções vasculares, dentre estas, a mais conhecida é a regulação do tono. O NO possui ainda outras funções tais como a regulação da coagulação, o controle do transporte de substâncias para o espaço subintimar, a participação ativa nas respostas inflamatória e imune, a proliferação e migração celular e também no balanço oxidativo. O NO é, portanto, elemento de elevada importância para a manutenção da homeostase circulatória e da parede vascular (Luz et al., 2005).

O NO é um gás livremente difusível, enzimaticamente sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e rapidamente inativado pelo ânion superóxido. O NO pode agir localmente no lúmen vascular, ou no músculo liso vascular promovendo relaxamento via guanilato ciclase (GC) (Gewalting & Kojda, 2002). Estímulos como a força de arrasto produzida pelo fluxo sanguíneo pulsátil, a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular, e a tensão de cisalhamento (*shear stress*) contribuem para ativação de células endoteliais e geração de níveis basais de NO, o que contribui para manter os vasos sanguíneos em estado de constante dilatação (Shesely et al., 1996; Cohen & Vanhoutte, 1995; Fisslthaler et al., 2000). O endotélio, em resposta a estímulos físicos ou químicos produz NO por meio da isoforma constitutiva da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Tendo em vista que o NO é uma molécula gasosa de alta difusibilidade nos meios biológicos, ocorre rápida difusão para as células do músculo liso vascular subjacentes. No citosol destas células a GC é ativada levando a um acúmulo de GMPc e ativação de PKG (do

inglês *cGMP dependent protein kinase*). Esta, por sua vez, irá fosforilar proteínas reguladoras de Ca^{2+} e proteínas contráteis. Como resultado, há diminuição da concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático, relaxamento do músculo liso vascular, dilatação do vaso sanguíneo, diminuição da resistência vascular e consequente aumento do fluxo (Luz et al., 2005).

Além de um potente vasodilatador, o também NO inibe a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão leucocitária. Inibe também a ativação e agregação de plaquetas e deprime a proliferação de células da musculatura lisa vascular (Ganz & Vita, 2003).

Além do NO, outras substâncias vasoativas são também produzidas pelo endotélio. De acordo com os efeitos principais, elas poderiam ser divididas em dois grupos: os fatores vasodilatadores e antiproliferativos, cabendo destacar entre eles o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI_2) e os fatores vasoconstritores/proliferativos, dentre os quais cabe destaque para as endotelinas, os endoperóxidos, o tromboxano, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a angiotensina II. Em condições fisiológicas, esses fatores agem de forma coordenada, e assim, as influências vasodilatadoras e vasoconstrictoras são localmente balanceadas regulando a resistência do leito vascular a fim de manter a perfusão adequada dos tecidos (Spieker et al., 2000; Widlansky et al., 2003) (figura 1).

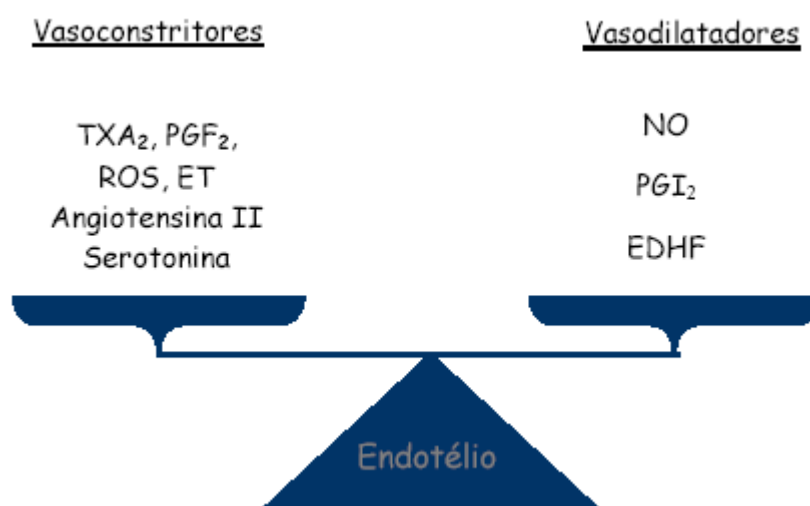


Figura 1: Principais fatores vasoativos liberados pelo endotélio vascular. PGF_2 prostaglandinas F2. TXA_2 : tromboxano A2. ROS: espécies reativas de oxigênio. ET: endotelina. NO: óxido nítrico. PGI_2 : prostaciclina. EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio. (Rattmann, 2009).

A degradação do NO ocorre predominante por meio da interação de NO com as ROS, como o ânion superóxido (O_2^-), gerando o peroxinitrito (NOO^-). A fim de se preservar uma adequada biodisponibilidade de NO, faz-se necessário haver balanço adequado entre o NO e as ROS na parede vascular, já que a interação entre estes é difusão limitada (Darley-Usmar et al, 1995). Em vigência de aumento de estresse oxidativo (aumento da concentração local das ROS), há redução da biodisponibilidade do NO, com o balanço local favorecendo os fatores vasoconstrictores/proliferativos. Desta forma, a concentração local de NO depende de um lado de sua produção, o que requer um endotélio íntegro e funcionante e, do outro lado, de uma remoção proporcional pelas ROS. Portanto, a produção local das ROS constitui importante mecanismo de regulação da biodisponibilidade de NO.

1.2 Disfunção Endotelial

O termo “disfunção endotelial” refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial dos mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. Alterações na função endotelial normal podem provocar perda de seu efeito protetor do sistema vascular por reduzir sua ação antitrombogênica e antiaterosclerótica contribuindo para a progressão do processo aterosclerótico com desenvolvimento de lesões e complicações clínicas mais tardias. Estudos revelam uma associação entre disfunção endotelial e fatores de risco cardiovascular, como o tabagismo (Zeiher et al., 1995), as dislipidemias (Creager et al., 1990), o diabetes (Johnstone et al., 1993), a hipertensão arterial (Panza et al., 1990; Taddei et al., 1993; Perticone et al., 1998) e a própria senilidade (Taddei et al., 1995). A fisiopatologia da disfunção endotelial inclui função vasomotora alterada com dificuldade de relaxamento da musculatura lisa vascular por estimulação da eNOS, estado pró-inflamatório e pró-trombótico e por fim aterogênese (Kasprzak et al., 2006). Embora a disfunção endotelial ocorra em diferentes processos patológicos, o estresse oxidativo pode ser identificado como um denominador comum (Griendling & FitzGerald, 2003). A figura 2 sumariza as causas e consequências da disfunção endotelial.

Uma importante característica da disfunção endotelial é a diminuição da síntese, liberação e biodisponibilidade de NO (Kasprzak et al., 2006). Isso tem sido amplamente usado como um marcador clínico da função endotelial e pode ser medido pela resposta vasomotora a um estímulo fisiológico (Saka et al., 2005) ou farmacológico (Suwaidi et al., 2000). A presença de disfunção endotelial pode servir como um indicador de estágios iniciais de insuficiência vascular. Esta detecção clínica precoce, mesmo na ausência de anormalidades anatômicas do vaso, é de grande relevância, pois permite uma intervenção apropriada prevenindo a progressão da lesão vascular. Dessa forma, a disfunção endotelial tem sido considerada há tempos como um preditor independente de eventos cardiovasculares (Schächinger et al., 2000; Halcox et al., 2002; Perticone et al., 2001; Heitzer et al., 2001).

Causas e consequências da Disfunção Endotelial

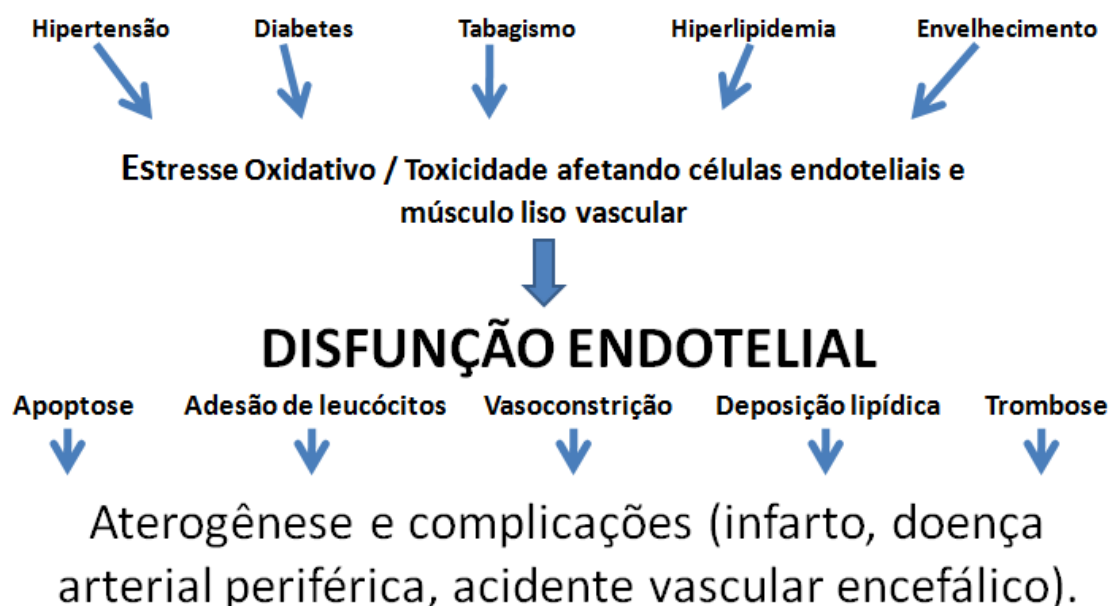


Figura 2: Evolução da disfunção endotelial a partir dos fatores de risco até a aterosclerose. Adaptado de Kasprzak, et al., 2006.

A análise da função endotelial, apesar de sua importância para o entendimento da história natural das doenças vasculares, não é tão simples, uma vez que os métodos de maior acurácia são invasivos.

A angiografia coronariana quantitativa é um exame eficaz para avaliar a função de artérias epicárdicas *in vivo*. Para isso, são usadas imagens de

alteração no diâmetro vascular em resposta às concentrações gradualmente maiores de vasodilatadores dependentes de endotélio, como a acetilcolina e bradicinina, injetadas diretamente nas coronárias por meio de cateter intra-arterial. Nesta técnica, ainda é possível a avaliação da função motora de vasos coronarianos de resistência através da medida de ultrassom com Doppler intracoronariano das respostas do fluxo sanguíneo a agentes vasoativos (Zeicher et al., 1991). O teste de função endotelial por angiografia coronariana possui como desvantagem seu custo elevado, e, por ser invasiva, incorrer em riscos para o paciente. Desta forma, esta técnica é essencialmente restrita para uso em pacientes que possuem diagnóstico clínico e que necessitam de cateterização cardíaca. Tais limitações levaram ao desenvolvimento de indicadores substituintes da função vasodilatadora vascular coronariana, utilizando-se tecnologias mais acessíveis e de menor custo e risco (Rush et al., 2005).

Atualmente, a disfunção endotelial pode ser detectada usando métodos simples, pouco invasivos, ou não invasivos que permitem medidas repetidas ao longo do tempo, e a possibilidade de testar a efetividade de várias intervenções que podem afetar a saúde vascular. Esses novos métodos são baseados na hipótese de que a disfunção endotelial seria sistêmica, isto é, não seria limitada a territórios específicos, como as artérias coronárias, mas envolveria todo leito arterial (Anderson et al., 1995a; Anderson et al., 1995b).

A pletismografia tem sido usada para avaliação da função vasomotora endotelial de vasos de resistência do antebraço. Baseia-se nas variações de volume do antebraço decorrentes das alterações do volume sanguíneo contido no leito vascular, o qual estaria relacionado aos processos de vasoconstrição ou vasodilatação da região avaliada. Além disso, a função endotelial também pode ser avaliada através da medida da velocidade do fluxo sanguíneo com o uso do ultrassom com Doppler após a infusão intra-arterial (braquial ou radial) de drogas vasoativas (Rush, 2005). O procedimento, embora simples, possui risco de complicações decorrentes da punção arterial, o que limita a disseminação do seu uso.

A medida não invasiva de vasodilatação mediada por fluxo (DMF) usando imagem de ultra-som de alta frequência após oclusão transitória da artéria braquial foi introduzida por Celermajer e colaboradores (1992) e, em

vista de sua simplicidade e segurança, tem sido amplamente utilizada em ambiente clínico e em pesquisa. A resposta de hiperemia reativa decorrente de isquemia provocada pela oclusão transitória da artéria braquial, é caracterizada por um pico de fluxo da artéria braquial que é sustentado por alguns segundos. A elevação do fluxo/*shear stress* causa dilatação da artéria braquial com resposta máxima tipicamente ocorrendo entre 45 a 90 segundos após a liberação da oclusão. Essa hiperemia, associada ao aumento da velocidade do fluxo sanguíneo, induz a liberação local de NO, resultando em vasodilatação que pode ser quantificada com um índice de função vasomotora (%DMF). O comprometimento da DMF braquial tem sido amplamente considerado como uma manifestação precoce, e potencialmente reversível, de doença vascular endotelial e pode representar uma medida integrada de várias agressões ao endotélio (Widlansky et al., 2003; Celermajer et al., 1992; Libby et al., 2002). Com base nesta consideração, Yeboah *et al* (2009), recentemente, demonstraram em estudo populacional que a DMF braquial é um preditor para eventos cardiovasculares incidentes em adultos sem doença cardiovascular conhecida, fornecendo dados que justificam a utilização da DMF em pesquisas futuras. Além do NO, novos biomarcadores da função endotelial têm sido investigados atualmente, dentro os quais os fatores inflamatórios e vasoconstritores, moléculas de adesão e células progenitoras endoteliais circulantes envolvidas na angiogênese e no reparo do endotélio lesado.

Para se promover saúde vascular, deve-se reduzir a agressão à parede dos vasos sanguíneos e potencializar mecanismos fisiológicos de reparo. Ao lado das intervenções farmacológicas para melhora da saúde vascular (Honda et al., 2009), intervenções no estilo de vida, tais como alimentação saudável e várias formas de treinamento físico podem prevenir ou até corrigir a disfunção endotelial em muitas doenças cardiovasculares.

1.3 Sistema Cardiovascular e o Exercício Físico

Ao longo dos últimos 50 anos, a noção de que o exercício aeróbico reduz a morbidade e mortalidade cardiovascular na população em geral, assim como em pacientes com doença arterial coronariana estabelecida, tornou-se cada vez mais evidente em vista de dados obtidos em estudos epidemiológicos. Os relatos iniciais mostraram que indivíduos em ocupações ativas possuíam menores índices de doenças cardíacas do que indivíduos com ocupações sedentárias (Morris et al., 1953; Morris & Crawford, 1958). A partir daí, iniciou-se a investigação de pessoas que realizavam atividades físicas recreativas, o que levou a resultados semelhantes (Morris et al., 1990). Mais tarde, as avaliações de condicionamento cardiorespiratório mostraram diminuição substancial de risco total de morbidade e mortalidade em pessoas moderadamente condicionadas (Blair et al., 1996; Lee et al., 1999).

Hoje, existe uma grande quantidade de evidências que mostram a importância do exercício físico na manutenção da saúde cardiovascular e prevenção de doenças, apresentando efeitos benéficos em muitas variáveis fisiológicas, tais como no perfil lipídico (Wood et al., 1991), na porcentagem de gordura corporal (Tran & Weltman, 1985; Wood et al., 1991), na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Helmrich et al., 1991) e na pressão sanguínea (Martin et al., 1990; Duncan et al., 1985). Também já está descrito na literatura que pessoas que se exercitam adequadamente são menos susceptíveis ao desenvolvimento de acidentes vasculares encefálicos (Booth et al., 2000), de algumas formas de câncer (Farrel et al., 2007), da obesidade (Di Pietro et al., 2004) e de osteoporose (Greendale et al., 1995). Tais evidências, dentre tantas outras acumuladas ao longo de algumas décadas, mostram que o exercício físico crônico, isto é, realizado de forma regular, orientada e sistematizada pode influenciar expressivamente o funcionamento cardiovascular resultando em benefícios para a saúde. A figura 3 sumariza os efeitos mediados pelo exercício sobre diferentes componentes do sistema cardiovascular que convergem para inibição dos processos que levam à aterosclerose.



Figura 3: Esquema do conjunto de efeitos decorrentes do exercício sobre o sistema cardiovascular e metabolismo. Adaptado de Niebauer & Cooke, 1996.

1.4 Função Endotelial e o Exercício Físico

Já está bem sedimentado o conhecimento de que o endotélio é essencial para saúde vascular, para regulação do tônus e manutenção da homeostase, uma vez que a disfunção endotelial está associada a vários processos fisiopatológicos sendo considerada um fator preditor de eventos cardiovasculares futuros. Estudos clínicos e experimentais mostram que o exercício físico regular é capaz de melhorar a função endotelial em pacientes que já exibem disfunção endotelial (Haram et al., 2008; Linke et al., 2008; Tabet et al., 2009).

As exigências metabólicas provocadas pelo exercício físico são satisfeitas pelo aumento na oferta de oxigênio e de substratos energéticos à musculatura exercitada, o que exige intensa vasodilatação muscular. Dentre os mecanismos vasodilatadores, destaca-se a produção do NO. A elevação do débito cardíaco e da pressão arterial durante o exercício aumenta o *shear stress*, ou seja, há um aumento da força que o sangue exerce sobre a parede

do vaso que, por sua vez, contribui para ativação das células endoteliais e consequente geração enzimática de NO (Luz et al., 2005). Dessa forma, o exercício funciona como um potente estímulo fisiológico para liberação de NO.

Os primeiros estudos a investigarem função endotelial por pletismografia em vasos de resistência e de condutância foram realizados em indivíduos adultos saudáveis após quatro semanas de treinamento localizado de *handgrip* (Green et al., 1994). Tais estudos sugeriram que o exercício localizado de um pequeno grupo de músculos não influencia a função endotelial em indivíduos saudáveis. A interpretação dada a este achado foi que o exercício localizado de um pequeno grupo de músculos não seria capaz de influenciar a função endotelial de indivíduos com função endotelial ainda normal ou ainda que o treinamento físico não induziria benefícios no sistema dilatador envolvendo NO. Tais benefícios seriam possíveis, entretanto, em indivíduos com disfunção endotelial já instalada.

Em estudo posterior (Clarkson et al., 1999) envolvendo a resposta vasodilatadora endotélio-dependente e utilização de imagem de ultrassom da artéria braquial, mostrou que após 10 semanas de programa treinamento físico diário de corrida, acrescido de sessões de treinamento de força, provocaram uma melhora da dilatação dependente de endotélio em homens jovens militares. Esse dado sugeria que exercícios mais prolongados e regulares poderiam atuar preventivamente na perda de função endotelial prevenindo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Maiorana et al. (2001), investigaram o efeito de oito semanas de treinamento combinando atividade aeróbica e exercício resistido, de intensidade moderada, na função vascular por pletismografia em homens jovens saudáveis de meia idade sedentários e mostraram que o treinamento não afetou significativamente a função vascular.

Em trabalho recente, Tinken e colaboradores (2010) examinaram a contribuição do shear stress para a adaptação vascular em resposta a um exercício bilateral de *handgrip* agudo e crônico de oito semanas de treinamento em homens jovens, usando a técnica de dilatação mediada por fluxo com avaliação simultânea do diâmetro arterial e velocidade de fluxo da artéria braquial. Este estudo demonstrou que as mudanças induzidas pelo exercício no *shear stress* fornecem o principal estímulo fisiológico para adaptação na

função endotelial mediada por fluxo e remodelamento vascular em resposta ao exercício em indivíduos saudáveis.

Muitos estudos também se dedicaram a avaliar os efeitos do treinamento físico sobre a função endotelial de indivíduos com doença cardiovascular já instalada. Hambrecht e colaboradores (2000) foram os primeiros a avaliar em estudo prospectivo, o efeito de quatro semanas de treinamento físico sobre a função endotelial em pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC) por angiografia coronariana quantitativa. Em quatro semanas de acompanhamento, houve declínio da vasoconstrição coronária induzida por acetilcolina e melhora do fluxo de reserva mediado por adenosina. Efeitos similares foram observados em pacientes com insuficiência cardíaca crônica em resposta a um programa de treinamento com exercício aeróbico (Hambrecht et al., 1998). Outros estudos ainda se dedicaram a investigar os efeitos do treinamento físico sobre a função endotelial em indivíduos que apresentavam fatores de risco cardiovascular, tais como: pacientes hipertensos (Higashi et al. 1999), diabéticos (Maiorana et al. 2001a) e com hipercolesterolemia (Lewis et al. 1999; Walsh et al. 2003). Tais pesquisas relataram efeitos sobre a função endotelial independentes daqueles já conhecidos sobre os fatores de risco cardiovascular, mostrando provável mecanismo direto relacionado ao *shear stress* que seria responsável pelos efeitos benéficos do treinamento físico. Portanto, os estudos até aqui são ainda inconclusivos em relação à possibilidade de se aumentar a função endotelial pelo exercício em indivíduos saudáveis. Entretanto, está bem consolidada na literatura a idéia de que o exercício constitui instrumento seguro de melhora da função endotelial em indivíduos com doença cardiovascular ou metabólica pré-existente.

Tendo em vista os achados já descritos, é levantado o questionamento sobre quais seriam os mecanismos responsáveis para tais efeitos do treinamento físico sobre a função vasodilatadora envolvendo NO. Já está bem estabelecido que o NO reage com espécies reativas de oxigênio (ROS) e que estas são capazes de reduzir a biodisponibilidade de NO. Incentivados por tal consideração, Adams e colaboradores (2005) analisaram o impacto do treinamento físico em pacientes com doença arterial coronariana (DAC), sobre fontes de geração de ROS, e observaram uma redução na expressão vascular da enzima NAD(P)H oxidase e do receptor AT1 de angiotensina II resultando

em redução local da geração de ROS. É possível ainda que a repetida indução da atividade da eNOS com o treinamento regular prolongue a meia-vida de NO por meio de uma redução de sua degradação por radicais livres, como proposto por Fukai et al. (2000). Hambrecht et al. (2003), em continuidade a uma série de estudos, investigaram os efeitos do treinamento físico em pacientes com DAC estável e verificaram, além de melhora da capacidade vasodilatadora dependente de endotélio, maior expressão da eNOS nos indivíduos treinados em relação ao controle, maior fosforilação da enzima a qual correlacionou-se com a capacidade vasodilatadora mediada por acetilcolina. Esse estudo revela que o treinamento físico melhora a função endotelial *in vivo* por estimular a expressão e aumentar a fosforilação da eNOS. Resultados similares foram encontrados por Zhang (2009) e colaboradores em camundongos com treinamento de corrida em esteira. A ativação de PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase*) e subsequente ativação de PKA e PKB (do inglês, *protein kinase A* e *protein kinase B*) resultou em fosforilação de eNOS com conseqüente aumento da atividade desta enzima e da produção de NO. Com base nos estudos acima descritos, é proposto um mecanismo molecular de ativação vascular pelo shear stress mediado pelo treinamento físico para a melhoria da disfunção endotelial envolvida nos processos patológicos, conforme pode ser visto no esquema da Figura 4.

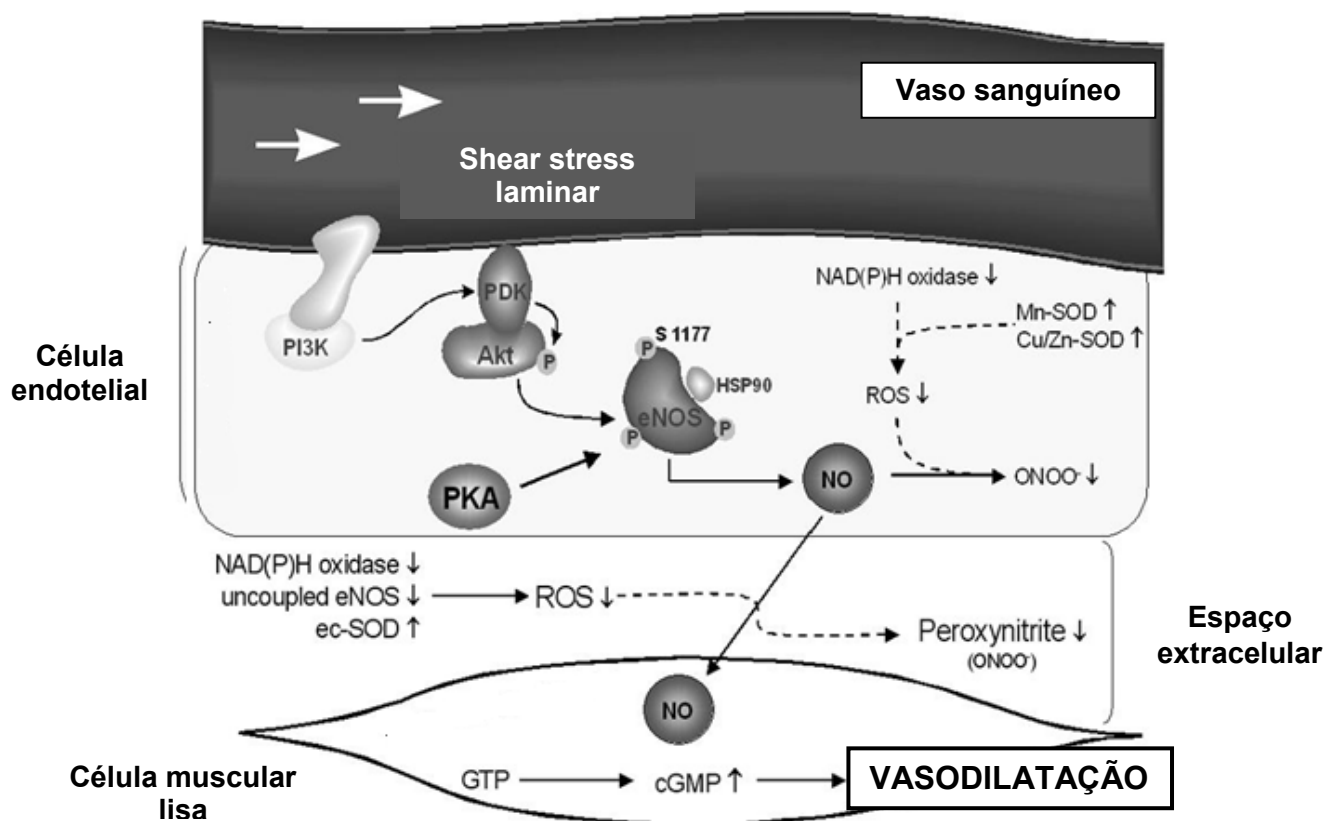


Figura 4: Mecanismos moleculares mediados por shear stress. PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; PKA: *protein kinase A*; PDK: *phosphoinositide-dependent kinase* eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; NADPH oxidase: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*; Mn-SOD: *Mn-superoxide dismutase*; Cu/Zn-SOD: *Cu/Zn-superoxide dismutase*; EcSOD: extracelular superoxide dismutase; ROS: espécies reativas de oxigênio. GTP: *Guanosine triphosphate*; cGMP: *Cyclic guanosine monophosphate*. Adaptado de Moebius-Winkler, 2010.

Goto e colaboradores (2003) levantaram evidências de que os efeitos do treinamento físico sobre a função endotelial sejam dependentes da intensidade e do tempo de exercício. Neste estudo, feito em homens jovens e saudáveis, somente 12 semanas de exercício moderado (50% do $VO_{2máx}$) aumentou a vasodilatação dependente de endotélio, ao passo que o exercício leve (25% do $VO_{2máx}$) e o de alta intensidade (75% do $VO_{2máx}$) não mostraram efeitos sobre a vasodilatação mediada por acetilcolina.

Com relação ao tempo de treinamento, acredita-se que durações variáveis de exercício físico possam influenciar a resposta arterial ao aumento do fluxo e do *shear stress*. Estudos relatam que a melhora da vasodilatação relacionada ao NO pode ser observada em treinamento de curto a médio-prazo. O exercício feito por períodos prolongados estaria determinando

adaptações estruturais nas artérias, resultando em aumento do calibre vascular que tenderia a normalizar o *shear stress* (Green et al., 2004; Prior et al., 2003).

1.5 Exercício Físico e Angiogênese

A formação de novos vasos é um importante processo no desenvolvimento embrionário e em processos de reparo tecidual, como ocorre nos processos de cicatrização ou no reparo pós oclusão arterial. A vasculogênese constitui a formação de novos vasos sanguíneos por progenitores endoteliais. Já a angiogênese e a arteriogênese referem-se ao brotamento e crescimento colateral de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, formando pontes colaterais entre redes arteriais (Carmeliet, 2003). Em alguns casos o termo angiogênese tem sido usado para incluir todas as formas de desenvolvimento vascular (Le Noble, 1998).

A integridade endotelial, após uma lesão, depende não somente da extensão de uma lesão, mas também da capacidade endógena de reparo. Dois mecanismos têm sido identificados com os quais este processo ocorre. No primeiro, células endoteliais maduras são capazes de se replicar localmente e substituir as células perdidas e danificadas. Mais recentemente, a mobilização de células progenitoras endoteliais (EPCs – do inglês *endothelial progenitor cells*) provenientes da medula óssea tem sido considerado como um mecanismo alternativo que desempenharia um papel significativo na manutenção e no reparo vascular em eventos cardiovasculares associados à perda de células endoteliais, tais como trombose e re-endotelização de dispositivos intravasculares (*stents*) (Deanfield et al., 2007). As células progenitoras demonstram capacidade de melhorar a angiogênese e a função endotelial, de inibir aterosclerose e de aumentar a função ventricular após infarto do miocárdio (Dimmeler, 2001; Schuh et al., 2008).

O treinamento físico como intervenção não farmacológica possui potencial para elevar o número e função de EPCs. Tal conceito é baseado em estudos demonstrando que programas de intervenção com exercício são capazes de melhorar a função endotelial de pacientes com DAC e insuficiência

cardíaca crônica sugerindo que as EPCs participariam do reparo de células endoteliais danificadas.

1.6 Células Progenitoras Endoteliais (EPCs)

Até as primeiras descrições sobre de EPCs, pensava-se que o processo de vasculogênese ocorria somente durante o desenvolvimento embrionário, mas não na vida pós-natal. De fato, há uma década, dois trabalhos relataram que células CD34⁺ humanas isoladas da medula óssea, de sangue periférico e de cordão umbilical, podiam se diferenciar em células endoteliais *in vitro* e *in vivo* em camundongos, contribuindo, portanto para a neoendotelização e neovascularização no organismo adulto (Asahara et al., 1997; Shi et al., 1998). Após estes trabalhos, vários grupos iniciaram investigações utilizando diferentes metodologias a fim de caracterizar as EPCs (Gehling et al. 2000, Gunsilius et al. 2000, Lin et al. 2000, Peichev et al. 2000). Outros estudos em animais sugeriram a incorporação destas células derivadas da medula óssea em vasos sanguíneos em locais de tumor (Lyden et al., 2001; Nolan et al., 2007), áreas de endotélio desnudo (Li et al., 2006; Urao et al., 2006), isquemia de membros inferiores (Takahashi et al., 1999) e após infarto do miocárdio (Jackson et al., 2001). Com o avanço na pesquisa de EPCs, o tradicional conceito de que a regeneração endotelial e angiogênese ocorrem exclusivamente por meio da proliferação de células endoteliais residentes na parede vascular foi contestado, evidenciando que a vasculogênese poderia ocorrer na vida pós-natal.

Hoje, ainda não existe um marcador claro e definido para caracterizar e quantificar com acurácia as EPCs circulantes. Permanece em debate o fato de estas células representarem ou não uma população estrutural e funcionalmente homogênea (Ingram et al., 2005). As técnicas mais frequentemente utilizadas para avaliação de EPC's são a citometria de fluxo e a quantificação e caracterização funcional após cultura celular.

A técnica de citometria de fluxo permite a rápida caracterização celular com a utilização de anticorpos que se ligam diretamente a marcadores específicos de superfície celular. A combinação de marcadores de células

tronco hematopoiéticas como CD34, CD117 (cKit) ou CD133, com um marcador de células endoteliais como Ve-caderina ou receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R2 ou KDR) são frequentemente usados para identificação de EPCs (Hristov et al., 2003; Urbich & Dimmeler, 2004; Adams et al., 2009). A correta caracterização de EPCs por citometria de fluxo é ainda incerta, apesar disso a definição CD34⁺/KDR⁺ tem sido freqüentemente utilizada.

A quantidade absoluta e relativa de EPCs na circulação periférica é baixa em condições basais (Khan et al., 2005). Porém, podem ser mobilizadas da medula óssea para os tecidos periféricos por meio de várias estímulos, como VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*), SDF-1 (do inglês *stromal cell-derived factor 1*), FGF-1 (do inglês *fibroblast growth factor*), G-CSF (do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*) e GM-CSF (do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Esses fatores são normalmente produzidos e secretados em situações de isquemia, hipóxia, inflamação ou neoplasia, participando ativamente na formação de novos vasos sanguíneos mediante diferenciação de células progenitoras em células endoteliais, ou seja, pelo processo conhecido como vasculogênese pós-natal (Asahara e Kawamoto, 2004; Urbich e Dimmeler, 2004), como conceituado anteriormente.

Além da mobilização decorrente da lesão tecidual, estudos descrevem mobilização destas células por estimulação exógena com estatinas (Vasa et al., 2001) e alguns anti-hipertensivos (Bahlmann et al., 2005; Sugiura et al., 2008; Pelliccia et al., 2009). Além disso, foi observada uma redução do número e/ou capacidade funcional destas células em diversas situações clínicas, como na presença de DAC ou mesmo de seus fatores de risco isoladamente, como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade, tabagismo, e na senescência (Vasa et al., 2001; Tepper et al., 2002; Werner et al., 2005). Atualmente, existe o conceito de que as EPCs atuam como um sistema de manutenção da homeostase vascular em humanos. Evidências indiretas para esse conceito foram sugeridas com a presença de uma correlação inversa encontrada entre o número de EPCs circulantes em sangue periférico e presença de aterosclerose, nível de disfunção cardiovascular, risco de morbidade e mortalidade cardiovascular (Vasa et al., 2001; Schmidt-Lucke et al., 2005;

Werner et al., 2005; Chironi et al., 2007). Portanto, a avaliação de EPCs poderia servir como um preditor de desfechos cardiovasculares, além disso, estaria auxiliando no monitoramento dos efeitos de estratégias primárias e secundárias de prevenção cardiovascular.

De acordo com alguns trabalhos, o principal mecanismo de mobilização de EPCs da medula óssea é dependente de ativação de eNOS na presença de vários fatores de mobilização, como o VEGF (Asahara et al., 1999) ou PIGF (do inglês, *placental growth factor*) (Li et al., 2006) e com a imprescindível participação de metaloproteinases (Cheng et al., 2007; Huang et al., 2009).

Com a descoberta dessas células e as propriedades a elas atribuídas, estudos clínicos e experimentais vêm sendo realizados no sentido de se determinar com melhor precisão o papel destas subpopulações de células progenitoras no envelhecimento e no aparecimento de disfunções vasculares tão comuns em muitas doenças. Hoje, busca-se desvendar qual é a exata função destas células para o reparo de células endoteliais lesadas. Com base nestes estudos, existem hoje dois conceitos sobre a potencial ação das EPCs. Inicialmente pensava-se em um envolvimento direto das EPCs no reparo da camada endotelial, essas células estariam sendo atraídas para o endotélio lesado diferenciando-se em células endoteliais maduras preenchendo esses espaços de células perdidas ou danificadas (Sata, 2003). Este conceito tem sido substituído mais recentemente por um possível efeito parácrino destas células. Secretando citocinas, elas estimulariam células endoteliais maduras melhorando seu desempenho (Urbich et al., 2005; Perry et al., 2009).

1.7 Exercício Físico e EPCs

Embora o exercício seja considerado um estímulo fisiológico para a mobilização de células provenientes da medula óssea (Brenner et al., 1998), existem poucos dados sobre os efeitos do exercício sobre células progenitoras circulantes (CPCs), especialmente EPCs, em atletas. Há mais de 20 anos, foi relatado aumento de células formadoras de colônias em sangue periférico de indivíduos saudáveis após uma curta e intensa sessão de exercício (Barret et al., 1978). Ainda, vários grupos já se dedicaram a estudar variáveis

hematológicas, como o aumento da contagem de leucócitos e neutrófilos com o exercício prolongado (Nieman et al., 1997; Brenner et al., 1998), além da liberação de hormônios como cortisol e o hormônio de crescimento (Suzuki et al., 2000) e de mediadores imunológicos, tais como o TNF- α (do inglês *tumor necrosis factor*), a IL-6 (do inglês *interleukin-6*) e o G-CSF (Ostrowski et al., 1999). Todos estes fatores promovem o crescimento e a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas (HPCs - do inglês hematopoietic progenitor cells) (Ikebuchi et al., 1988). Incentivados por tais informações, Bonsignore e colaboradores (2002) investigaram se a contagem de CPCs poderia diferir entre indivíduos com treinamento amador de *endurance* e sedentários, tendo observado maiores níveis de células CD34⁺ em treinados. Já Thijssen et. al (2006) não encontraram tal diferença na contagem celular basal entre indivíduos jovens treinados e sedentários.

Os estudos analisando o impacto do exercício sobre a quantificação das EPCs circulantes ainda é relativamente pequeno. Entretanto, os dados disponíveis dão suporte à idéia de que existam efeitos distintos entre os tipos de programas de treinamento em diferentes populações de indivíduos. Adams et al. (2004) investigaram a influência de uma sessão isolada do teste de esforço máximo em pacientes com DAC sobre o número de EPCs por citometria de fluxo e cultura celular. Observaram que os sintomáticos responderam com um aumento tempo dependente de EPCs CD34⁺KDR⁺ circulantes, o que não foi encontrado nos pacientes assintomáticos e nos controles saudáveis. Em estudo experimental, o exercício de corrida em camundongos promoveu um aumento de EPCs por um mecanismo relacionado à biodisponibilidade de NO. Além disso, no mesmo estudo, um programa de treinamento de quatro semanas foi associado com *up regulation* de EPCs CD34⁺KDR⁺ em pacientes idosos com DAC documentada (Laufs, 2004).

Em outro estudo clínico utilizando um programa de treinamento de 12 semanas de sessões de corrida supervisionada, Steiner et al (2005) observaram um aumento de EPCs CD34⁺CD133⁺KDR⁺ tanto em indivíduos com DAC, quanto naqueles apenas com fatores de risco cardiovascular. Associado a estes achados, este aumento ainda teve uma correlação positiva com DMF mostrando estar associado com uma melhora da função vascular. Em conformidade com distintos trabalhos avaliando a relação do exercício

físico sobre as EPCs, há ainda os que se dedicaram a estudar os efeitos do treinamento físico em outras populações de indivíduos, como em pacientes submetidos à hemodiálise (Manfredini, 2009), e até mesmo em crianças saudáveis (Walther, 2009). Vale ressaltar que, o “fator chave” para a mobilização de EPCs na DAC é a isquemia induzida pelo exercício (Adams, 2004), apresentando, dessa forma um padrão de alterações nos níveis de EPC's diferente do observado em indivíduos saudáveis. Entretanto, ainda são pouco conhecidos os efeitos diretos da atividade física e o número de EPCs circulante na ausência de doença vascular em humanos.

Existe a necessidade de se estabelecer a intensidade e duração do treinamento ideais para a regulação dos níveis destas células, bem como, o tempo em que cursa a mobilização de EPCs após o exercício. Levando isso em consideração, Laufs e colaboradores (2005) quantificaram EPCs por citometria de fluxo e cultura celular em voluntários saudáveis submetidos a três protocolos de exercício de corrida. Neste estudo, o exercício intenso e moderado, por 30 minutos, mas não por 10 minutos, agudamente aumentou os níveis de EPC's. Ainda, Rehman et al. (2004) mostram que uma sessão relativamente curta de exercício exaustivo elevou tanto a contagem de EPC's circulantes quanto em cultura celular.

No que diz respeito à duração e intensidade de uma sessão de exercício foi observado em maratonistas, imediatamente após a corrida, redução significativa de células CD34⁺ e de células CD133⁺, junto à redução dos níveis de VEGF, mas sem alteração no número de EPCs (Adams, 2008). Já em atletas que participaram de corrida de longa distância (246 km), a contagem de EPCs aumentou no final da corrida e permaneceu elevada por até 48 horas após (Goussetis, 2009). Esses achados indicam que a mobilização de EPCs da medula óssea depende da intensidade do exercício e pode distintamente afetar diferentes linhagens e populações de células progenitoras (Shantsila & Lip, 2009). Ainda neste mesmo contexto, em trabalho recentemente publicado, Möbius-Winkler e colaboradores (2009) dedicaram-se a estudar a cinética de mobilização de células progenitoras circulantes durante programa padronizado de exercício de *endurance* com duração longa (240 minutos) em indivíduos jovens saudáveis. Este estudo mostrou um aumento significativo e tempo-

dependente, com níveis máximos entre 210/240 minutos retornando ao basal em aproximadamente 24 horas.

Estes dados confirmam o potencial do exercício em não só produzir efeitos benéficos para a fisiologia vascular, mas também em mobilizar células progenitoras provenientes medula óssea. Grande parte dos estudos tem dado enfoque à realização de diferentes programas de exercício em grupos distintos de indivíduos que, em geral, já possuíam algum processo patológico documentado. Entretanto, o efeito do exercício crônico, ou seja, ao longo dos anos, sobre os níveis basais destas células na circulação periférica de indivíduos saudáveis ainda é pouco conhecido. Dados correlacionando a quantificação de tais células com a função vascular nesta população são ainda mais escassos. Sendo assim, nosso estudo concentrou-se em avaliar os níveis basais de CPCs e EPCs em atletas masculinos, com treinamento de *endurance*, promovido por corridas de longa distância, em situação de pelo menos 24 horas de repouso. Para o grupo controle, foi escolhido um grupo de homens, na mesma faixa etária, sedentários e também saudáveis. Adicionalmente, investigamos a existência de correlação das EPCs com a função vascular nesses indivíduos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis percentuais de CPCs e EPCs em sangue periférico e sua possível correlação com a função endotelial de homens saudáveis, praticantes de corrida de longa distância, em situação de pelo menos 24 horas e em sedentários saudáveis.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos do treinamento aeróbico a longo prazo sobre parâmetros bioquímicos em relação à indivíduos sedentários;

2.2.2 Mensurar marcadores de lesão muscular em homens treinados e sedentários;

2.2.3 Comparar medida de função endotelial em homens treinados e sedentários por meio de ultrassom vascular de alta resolução.

2.2.4 Analisar o perfil de distribuição da variável utilizada para quantificação celular;

2.2.5 Mensurar níveis de CPCs e EPCs em sangue periférico por citometria de fluxo nos indivíduos treinados e sedentários

2.2.6 Investigar a existência ou não de uma correlação entre os níveis de EPCs com a medida de função endotelial.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado como um dos subprojetos do estudo denominado “Parâmetros Estruturais e Funcionais do Coração e de Vasos Sanguíneos de Indivíduos Submetidos, por longo prazo, ao Treinamento Aeróbico ou Resistido” (Projeto ESCHOT) realizado na Clínica de Investigação Cardiovascular (CIC) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFES. O projeto ESCHOT foi desenvolvido com a finalidade de se avaliar como estas duas modalidades de exercício, praticados por longo tempo, afetam os parâmetros cardiovasculares, bioquímicos e metabólicos de indivíduos do sexo masculino.

3.1 Delineamento e Seleção da Amostra do Estudo ESCHOT

O estudo teve natureza observacional e transversal. Os indivíduos foram convidados a participar do estudo a partir de contatos firmados por pesquisadores com possíveis candidatos que praticam regularmente treinamento de corrida de rua, academias e outros locais ou exercício resistido (exercício de força). Após o contato inicial era preenchido um questionário para verificar se o indivíduo preenchia as condições de elegibilidade e não possuía critérios de exclusão. Os participantes deveriam ser do sexo masculino, idade entre 20 e 60 anos, ser aparentemente sadio e não estar sob uso regular de qualquer medicamento para doenças crônicas. O interesse era por indivíduos que recebiam treinamento predominantemente de *endurance* (corrida), exercício resistido ou por indivíduos sedentários nos últimos 6 meses antes de inclusão no estudo.

A amostra foi composta de 126 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 21 e 58 anos, com graus variáveis de escolaridade, classificação étnica e socioeconômica. Os participantes foram divididos em 3 grupos de acordo com o tipo de exercício físico e sua frequência de realização.

GRUPO 1 (TR, N=35): Grupo de Treinamento Resistido, composto por praticantes de treinamento de força há, pelo menos, 2 anos, e com índice de

mesomorfia predominante em comparação aos índices de ectomorfia e endomorfia;

GRUPO 2 (TA, N=48): Grupo de Treinamento Aeróbico, composto por indivíduos com treinamento de corrida há, pelo menos, 2 anos, com carga de treinamento superior a 40 Km por semana, divididas em 3 ou mais sessões semanais feitas à velocidade ≥ 15 km/h.

GRUPO 3 (CT, N=43): Grupo Controle composto por indivíduos sem envolvimento com qualquer uma das modalidades acima no último ano e com carga de atividade aeróbica ≤ 3 sessões por semana com duração ≤ 30 minutos por sessão.

Após o convite feito em entrevista os participantes eram instruídos a respeito dos objetivos e procedimentos da pesquisa. Após assinatura de termo de consentimento para participação no estudo era feito o agendamento de visita à CIC para a realização de exames conforme esquema apresentado na figura 5.

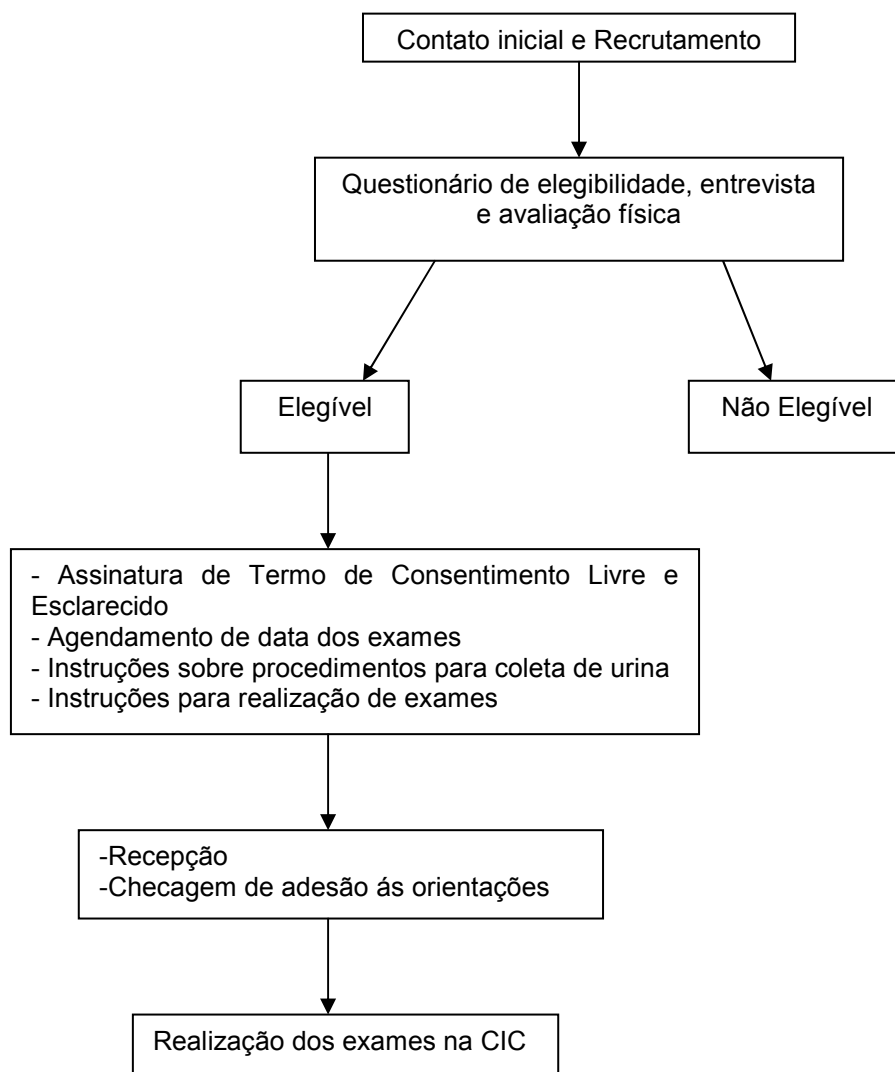


Figura 5: Fluxograma representativo das etapas de seleção dos indivíduos do projeto ESCHOT até a realização dos exames. CIC: clínica de investigação cardiovascular.

3.2 Orientações ao Participante para a Ida à CIC

Na realização do pré-agendamento o participante era instruído por um pesquisador treinado sobre as seguintes orientações:

- Manter jejum nas 12 horas precedentes à realização dos exames e se abster de qualquer alimento ou bebida que possua cafeína em sua composição por período de 24 horas antes dos exames.

- Não realizar exercício intenso (como corrida, ginástica, fazer serviços domésticos pesados) nas 24 horas antes da realização dos exames. Em

especial os participantes dos grupos TR e TA eram orientados a interromper o treinamento físico por igual período.

- Caso o participante estivesse fazendo o uso de suplementos alimentares contendo polivitamínicos, interromper o uso no dia anterior à realização dos exames.

3.3 Realização dos Testes, Medidas e Exames

Após chegada à CIC, entre 07:00 e 08:00 h da manhã, os participantes deveriam entregar o frasco com a urina coletada no período de 12 h (das 19:00 h às 07:00 h), conforme padronização realizada anteriormente (Molina, 2002). Em seguida o indivíduo era submetido aos seguintes procedimentos:

(a) Preenchimento de questionário com dados pessoais, informações sobre condições de vida, saúde e parâmetros nutricionais, história de treinamento físico, histórico de uso de métodos e processos para indução de hipertrofia muscular que não o exercício físico.

(c) Coleta de sangue por venopunção no antebraço

(d) Avaliação antropométrica

(e) Medidas da pressão arterial

(f) Eletrocardiograma de repouso

(g) Variabilidade da frequência cardíaca

(h) Velocidade de Onda de Pulso (VOP) carotídeo-femural

(i) Tonometria de Pulso Arterial

(j) Ecocardiografia

(l) Teste de função vagal (teste de 4 segundos)

(m) Teste Pressórico do Frio

(n) Vasodilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial

Todos os exames foram realizados no mesmo dia, exceto o ecocardiograma que em alguns indivíduos era feito em outro dia no período da tarde. Além disso, era agendado uma ergoespirometria a ser realizada no Laboratório de Fisiologia do Exercício (Lafex) do Centro de Educação Física e Desportos da Ufes.

Para o alcance dos objetivos propostos neste estudo, serão apresentados basicamente, além dos dados gerais dos indivíduos, a medida de células progenitoras no sangue venoso e os dados do teste de vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial.

3.3.1 TESTE DE DILATAÇÃO MEDIADA POR FLUXO DA ARTÉRIA BRAQUIAL

A avaliação da função endotelial foi realizada em jejum de 12 horas, antes da coleta das amostras de sangue e com abstenção de uso de cafeína, tabaco ou vitaminas para evitar interferência nos resultados do exame (Harris et al., 2010). O protocolo descrito a seguir foi o mesmo utilizado no MESA (Multiethnic Study in Atherosclerosis) (Yeboah et al., 2009).

Inicialmente o indivíduo era mantido em sala silenciosa e tranquila, com temperatura controlada (20-22°C), deitado em maca na posição supina por aproximadamente 10 min. Em seguida era feita a medida da pressão arterial em ambos os braços, utilizando-se aparelho oscilométrico automático (OMRON 765CP, USA) com manguito apropriado para o diâmetro do braço do participante, segundo especificação do fabricante. Em todos os indivíduos testados a diferença de pressão arterial sistólica e diastólica entre os braços foi inferior, respectivamente, a 15 mmHg e 10 mmHg, indicando não haver comprometimento da árvore arterial que nutre os membros superiores, o que inviabilizaria a realização do exame.

A medida do diâmetro da artéria braquial direita foi feita com plataforma de ultrassonografia de alta resolução (Toshiba, Aplio XG Model SSA-790^a, Japão), usando-se transdutor linear de 7,5 a 12,0 MHz (Toshiba PLT-704AT, Japão). Após a coleta dos dados do exame, as leituras foram feitas *off line* por investigador treinado e certificado para realização das medidas e cego em relação aos grupos. A leitura era feita com auxílio de software para análise de imagens dimensionais e Doppler. A medida do diâmetro arterial era feita em coincidência com o pico da R indicando leitura feita exatamente ao final da diástole ventricular (Corretti et al., 2002; Harris et al., 2010), conforme mostra a figura 6. Para obtenção da imagem da artéria braquial, o probe do ultrassom foi

posicionado 5 a 9 cm acima da fossa antecubital, e o cuff de oclusão posicionado distalmente ao probe e ao longo do antebraço.

Após acertos no equipamento e determinada a posição ideal para medida do diâmetro arterial elevava-se a pressão no manguito do braço direito para uma pressão 25 a 50 mmHg superior à pressão arterial sistólica medida anteriormente, mantendo-se essa pressão por um período de isquemia do membro de 5 minutos.

Para avaliação das alterações da velocidade do fluxo (cm/s) e do diâmetro vascular (mm), foram gravados 8 vídeos de 20 segundos cada um com as imagens de ultrasson. O diâmetro arterial basal era medido em 6 ciclos cardíacos consecutivos, extraindo-se a média dos valores para se determinar o diâmetro basal médio. O segundo vídeo, também no estado basal, foi gravado para determinar o a velocidade basal do fluxo sanguíneo. O terceiro vídeo três teve início 10 segundos antes da liberação do cuff e nos 10 segundos subsequentes, com intuito de se obter um registro da velocidade do fluxo sanguíneo momentos após a liberação do fluxo quando o sangue atinge a velocidade máxima. Essa velocidade reflete a hiperemia reativa à isquemia transitória. Tanto para a medida basal como naquela após a liberação da oclusão, a velocidade do fluxo foi determinada com um *Doppler* de 1,2 mm de volume no lúmen vascular com correção do software para ângulo de incidência de 60°.

A cinética temporal da variação do diâmetro arterial foi determinada nos vídeos subsequentes obtidos aos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, 100 e 110 segundos após a liberação do cuff do manguito de pressão conforme apresentado na figura 7. A dilatação arterial máxima ocorreu em grande parte dos indivíduos cerca de 60 segundos após a liberação do cuff, conforme já descrito na literatura (Celermajer et al., 1992). A dilatação mediada por fluxo foi calculada como mudança percentual máxima no diâmetro arterial após a liberação do cuff comparado ao diâmetro arterial em repouso (%DMF).

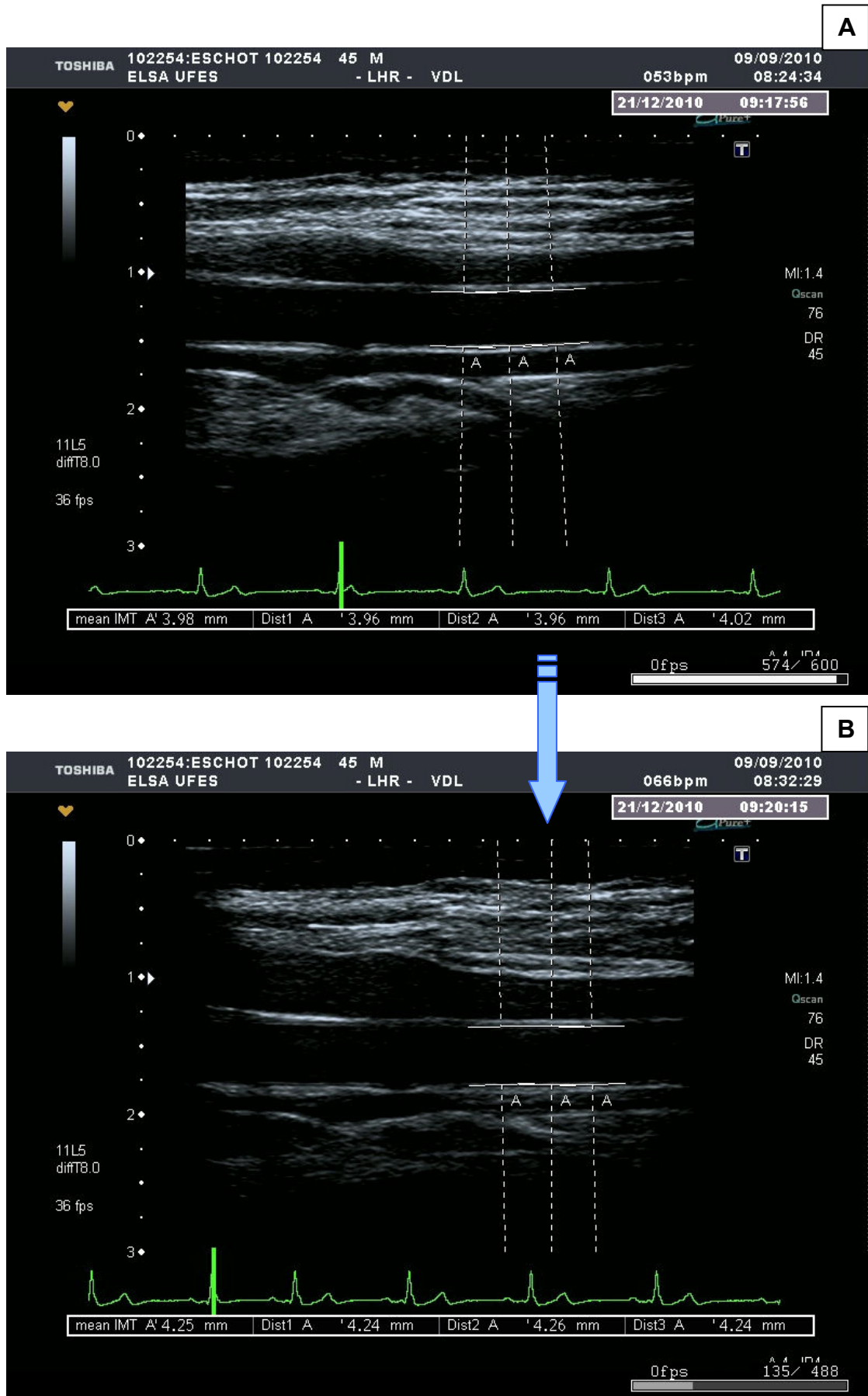


Figura 6: Imagens ilustrativas de um exame de medida de diâmetro arterial. A) Diâmetro basal, média de 3 pontos de medida. B) Pico de diâmetro alcançado após hiperemia reativa.

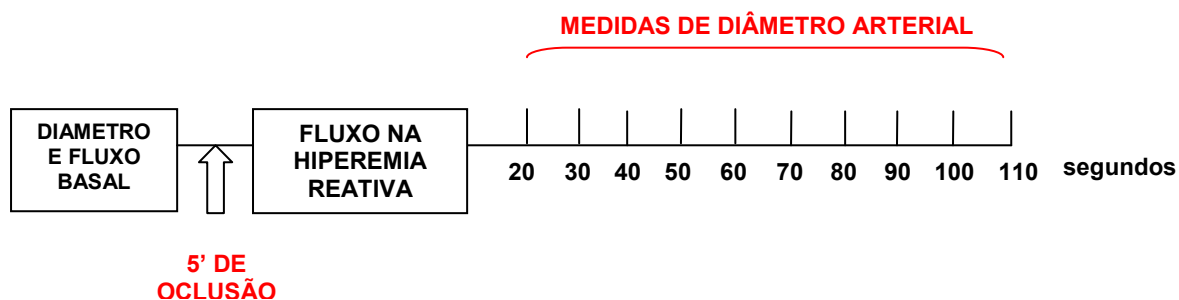


Figura 7: Esquema do protocolo de medidas do fluxo sanguíneo (cm/s) e diâmetro (mm) obtidas por ultrassom vascular.

3.3.2 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue eram obtidas por venopunção na região da fossa antecubital em tubos de coleta a vácuo. Estas eram previamente processadas na CIC e encaminhadas para o Laboratório Central do SESI, em Vitória para realização do hemograma padrão, exames bioquímicos de rotina: dosagens séricas de colesterol total e frações, triglicerídeos, ácido úrico, creatinina e uréia. E para a realização das medidas enzimáticas da creatina quinase (CK) total e fração MB (CK-MB) séricas. Todos os exames foram feitos de acordo com as técnicas padronizadas para análises clínicas e os mesmos kits de dosagem foram usados durante todo o estudo.

3.4 Quantificação de EPCs e CPCs por Citometria de Fluxo

Células progenitoras circulantes (CPCs) podem ser identificadas no sangue periférico através da expressão de marcadores de superfície celular. Para isso, a técnica de citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais, tem sido amplamente empregada, pois permite avaliação rápida e simultânea de diferentes parâmetros de uma mesma célula e de diferentes subpopulações.

A quantificação de CPCs e EPCs em citometria de fluxo foi realizada em sangue periférico total colhido em tubo contendo EDTA como anticoagulante. A marcação fenotípica das células foi feita com até uma hora após a coleta do material.

Alíquotas de 200µL da amostra de sangue total foram colocadas em 3 tubos de marcação, e pré-incubadas com 100 µL de uma solução de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) na concentração de 10% diluído em PBS pH 7.4 (Gibco) por 20 minutos, em refrigeração (5 a 8°C) para bloqueio de ligações inespecíficas (Khan, 2005). Em seguida, 6 µL de anticorpos monoclonais ou isotipos controle conjugados a fluorocromos foram adicionados aos tubos conforme a figura 8, e incubados por período de 30 minutos, também sob refrigeração (5 a 8°C) ao abrigo da luz. Foram montados dois painéis com os seguintes anticorpos monoclonais: CD34 FITC/CD133 PE (Becton Dickson e Miltenyi Biotec respectivamente) e CD34 FITC/KDR PE (Becton Dickson).

Neste trabalho, foram identificadas as células CD34⁺, CD133⁺ e CD34⁺CD133⁺ como CPCs e CD34⁺KDR⁺ como EPCs.

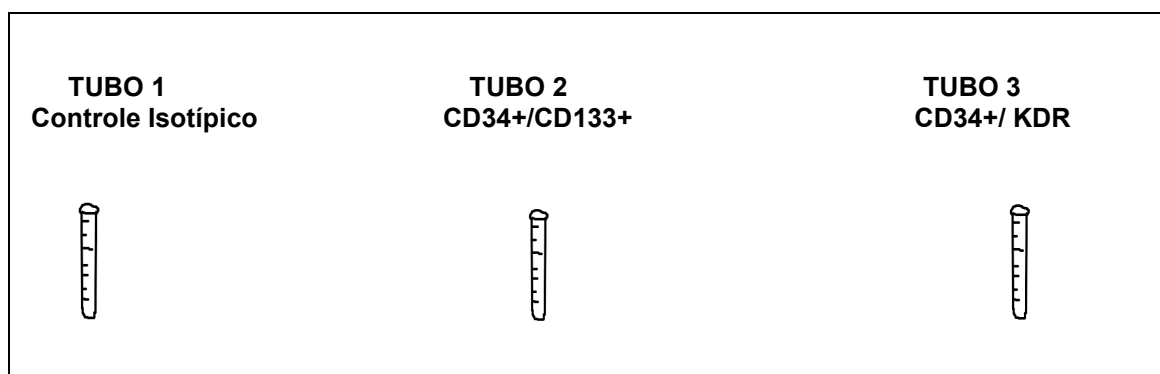


Figura 8: Ilustração das combinações de marcadores utilizados para identificação de CPCs e EPCs.

Logo após essa etapa, a lise de eritrócitos foi realizada adicionando-se 3 mL de solução de lise (Becton Dickinson) sob agitação em vortex, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1400 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado de uma só vez vertendo o tubo e o sedimento de células foi ressuspensão manualmente. A este último foram adicionados 3 mL de solução de BSA (Sigma) na concentração de 1% diluído em PBS pH 7.4 (Gibco) seguindo-se de agitação em vortex e nova centrifugação a 1400 rpm por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado como anteriormente e o sedimento de células ressuspensão com solução fixadora contendo paraformaldeído a 1%, cacodilato de sódio 1,08% e cloreto de sódio a 0,67%. As amostras eram deixadas em repouso a 5-8°C ao abrigo da luz até o momento da leitura. A aquisição foi realizada em citômetro FACS Calibur (BD –

Becton Dickson, San Jose, CA, EUA) e os gráficos analisados no software WinMDI 2.9. As células foram adquiridas com 500 mil eventos (Fadini, 2008). Apenas 5 amostras foram adquiridas com menos de 500 mil eventos (mínimo: 100 mil), e 2 amostras foram adquiridas com mais de 500 mil eventos (máximo: 650 mil).

3.5 Análise dos Dados de Imunofenotipagem de EPCs e CPCs

A quantificação das células de interesse baseou-se inicialmente na avaliação gráfica do tamanho (parâmetro FSC, do inglês *forward scatter*) e complexidade interna (parâmetro SSC, do inglês *side scatter*) selecionando-se a subpopulação de linfócitos (região R1) a partir da população total de leucócitos. Dentro desta região, as células marcadas com o anticorpo monoclonal anti CD34 FITC ou CD133PE foram selecionadas (região R2 ou R3) e montado novo gráfico de quadrante incluindo R1 para identificação das células duplamente marcadas com CD34/CD133 ou CD34/KDR (Figura 9) conforme descrito por Steiner (2005). A mesma forma de análise foi realizada para os tubos com os anticorpos de controle isotípico.

A partir desta análise, foram obtidos os eventos positivamente marcados com os anticorpos de interesse e estes foram normalizados pelo número de eventos *gated* na região de linfócitos, e os resultados representados como percentual de eventos positivos em células mononucleares (CMN) conforme descrito anteriormente (Schmidt-Lucke, 2005). Para quantificação de células CD34⁺, foi utilizada a média de valores obtidos nos tubos 2 e 3.

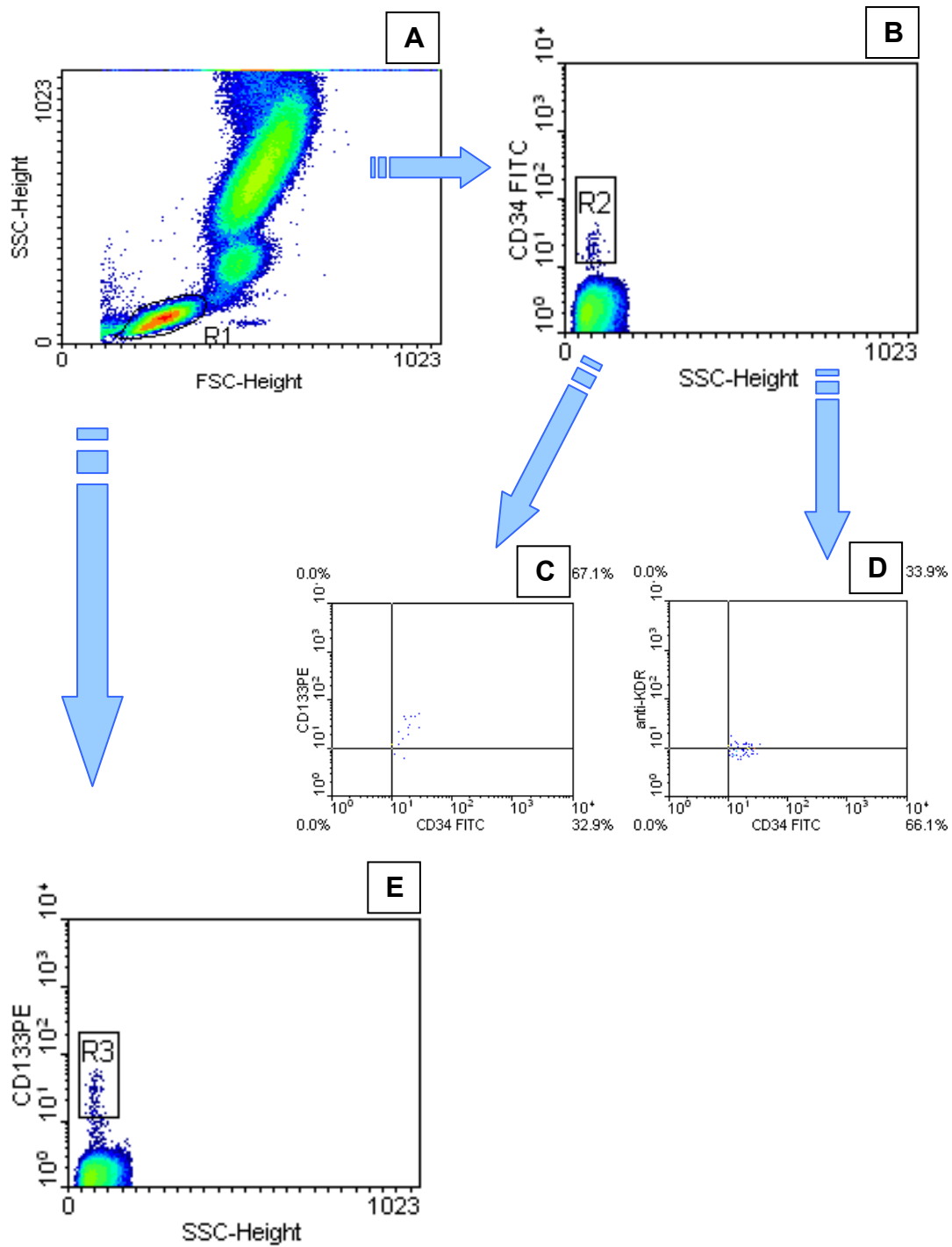


Figura 9: Gráficos representativos ilustrando a estratégia de *gating* usada para quantificar CPCs e EPCs por citometria de fluxo. Em (A) foi identificada a população de linfócitos em R1. (B) células CD34⁺ e (E) CD133⁺ foram identificadas na região linfocítica e positivas para o anticorpo específico. Após *gate* nas células CD34⁺, foi identificada a coexpressão de (C) CD133⁺ ou (D) KDR⁺. As unidades do eixo X e Y são unidades arbitrárias de fluorescência.

3.6 Análise Estatística

O padrão de normalidade para distribuição das variáveis foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal são apresentadas como média \pm erro padrão da média (epm) e a comparação de médias foi feita com o teste de t de Student. As variáveis não distribuídas normalmente são expressas como mediana e epm, sendo a comparação de medianas feita pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O grau de correlação foi calculado pelo coeficiente de Spearman (r) para os dados não paramétricos e pelo coeficiente de Pearson (r) para os dados paramétricos. Os testes estatísticos foram realizados no software SPSS versão 13.0. Para a construção dos gráficos utilizou-se o software OriginPro versão 6.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Características da Amostra

Dos 126 participantes do Projeto ESCHOT, foi feita a identificação de CPCs e EPCs em sangue periférico em 96 destes; sendo 30 do grupo CT, 38 do grupo TA e 28 do grupo TR. Não conseguimos realizar a quantificação celular em 30 indivíduos, sendo 11 por não ter sido feita a coleta de sangue para esta finalidade e 19 por problemas técnicos (basicamente por problemas de acesso ao equipamento de citometria de fluxo).

A avaliação da função endotelial pela vasodilatação mediada por fluxo foi feita em 109 indivíduos, dos quais 37 pertenciam ao grupo CT, 45 ao grupo TA e 27 ao grupo TR. Em 3 participantes não foi possível a obtenção do dado por problemas técnicos de aquisição de imagem. Em outros 13 o teste não foi realizado por ausência de examinador e por alguns participantes estarem no limite do período de jejum (estabelecido para ser de até 14 horas).

Como dito anteriormente os grupos de interesse neste estudo foram o TA e CT. Portanto, os dados mostrados a seguir serão referentes a estes dois grupos. A tabela 1 apresenta as características demográficas e clínicas das amostras. Os dados mostram que os indivíduos foram similares em relação à composição corporal, pressão arterial, glicemia de jejum, colesterol e triglicerídios. Como esperado, a concentração do HDL-colesterol foi maior nos indivíduos do grupo com treinamento aeróbico.

A média de idade dos participantes do grupo CT e TA juntos foi de 36 ± 1 anos de idade, sendo a faixa de idade de 21 a 58 anos. Separadamente analisados, o grupo CT teve uma idade média de 33 ± 1 e faixa de idade de 23 a 50 anos, e o grupo TA 39 ± 1 anos de idade com faixa de etária entre 21-58 apresentando diferença significativa entre os grupos ($p < 0,01$).

	Grupo Controle n=43	Treinamento Aeróbico n=48
Idade (anos)	33 ± 1	39 ± 1*
IMC (kg/m²)	24,0 ± 0,7	23,6 ± 0,4
Gordura (%)	18,1 ± 0,8	16,0 ± 0,8
PAS (mmHg)	112 ± 2	115 ± 1
PAD (mmHg)	68 ± 1	68 ± 1
Glicose (mg/dL)	85,3 ± 1	86,9 ± 1
Colesterol (mg/dL)	165,9 ± 5,1	166,9 ± 5,9
Triglicerídeos (mg/dL)	84 ± 11,5	82 ± 6,4
HDL-c (mg/dL)	45,1 ± 1,4	51,8 ± 1,5*
LDL-c (mg/dL)	98,9 ± 4,5	97,1 ± 5,0
Tempo de treinamento (anos)	-	10 ± 1

Tabela 1: Características demográficas e clínicas da população. Valores representados como média ± EPM. Os dados não normalmente distribuídos foram representados como mediana ± EPM. IMC: Índice de massa corporal. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica. HDL-c: HDL-colesterol. LDL-c: LDL-colesterol. Diferença significativa com $P < 0,05$ em relação ao grupo controle (*).

4.2 Parâmetros Enzimáticos

A figura 10 apresenta os níveis séricos de creatina quinase (CK) nos grupos de estudo. Os dados não apresentaram distribuição normal e por esse motivo foram representados como mediana ± epm. Observou-se que o grupo TA apresentou maiores níveis de CK quando comparado ao grupo CT.

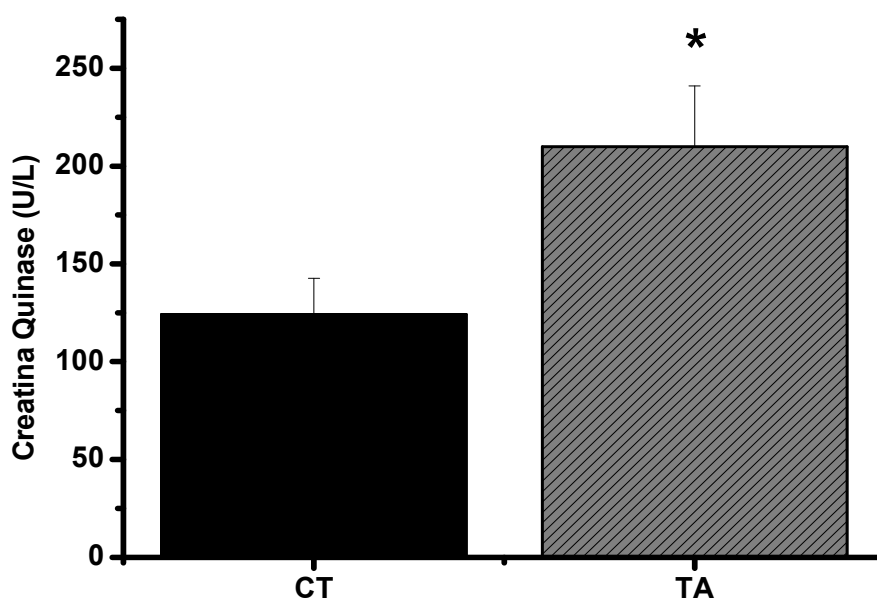


Figura 10: Níveis séricos de Creatina Quinase no grupo Controle (CT, n= 40) e no grupo de Treinamento Aeróbico (TA, n= 47). Valores expressos em mediana \pm EPM. (*) Diferença significativa com $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.

Ainda, foi realizada a dosagem sérica da isoforma MB de creatina quinase (CK-MB), e da mesma forma, os dados não apresentaram distribuição normal sendo representados como mediana \pm epm na figura 11. Também foram observados maiores níveis plasmáticos no grupo TA em relação ao grupo CT.

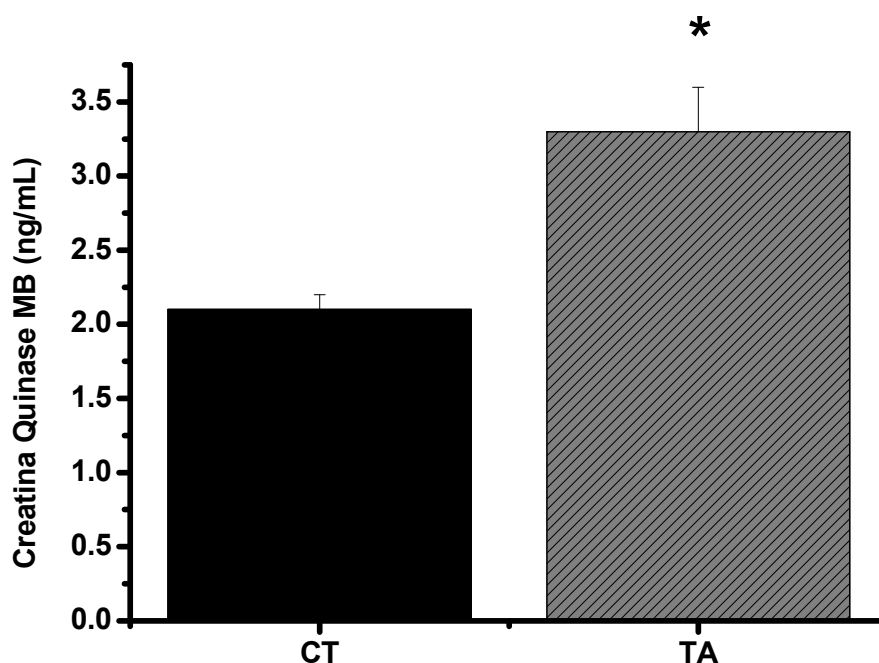


Figura 11: Níveis séricos de Creatina Quinase no grupo Controle (CT, n= 40) e no grupo de Treinamento Aeróbico (TA, n= 47). Valores expressos em mediana \pm EPM. (*) Diferença significativa com $p < 0,01$ em relação ao grupo Controle.

4.3 Distribuição da Variável: Contagem Celular

A contagem celular de CPCs e EPCs no sangue venoso periférico foi representada como porcentagem de eventos positivos em CMN (células mononucleares) *gated* na região de linfócitos. A contagem de células $CD34^+$ e $CD133^+$ não apresentar distribuição normal como é mostrado nas figuras 12 e 13. De igual forma as subpopulações $CD34^+/CD133^+$ e $CD34^+/KDR^+$ também não apresentaram distribuição normal como pode ser mostrado nas figuras 14 e 15.

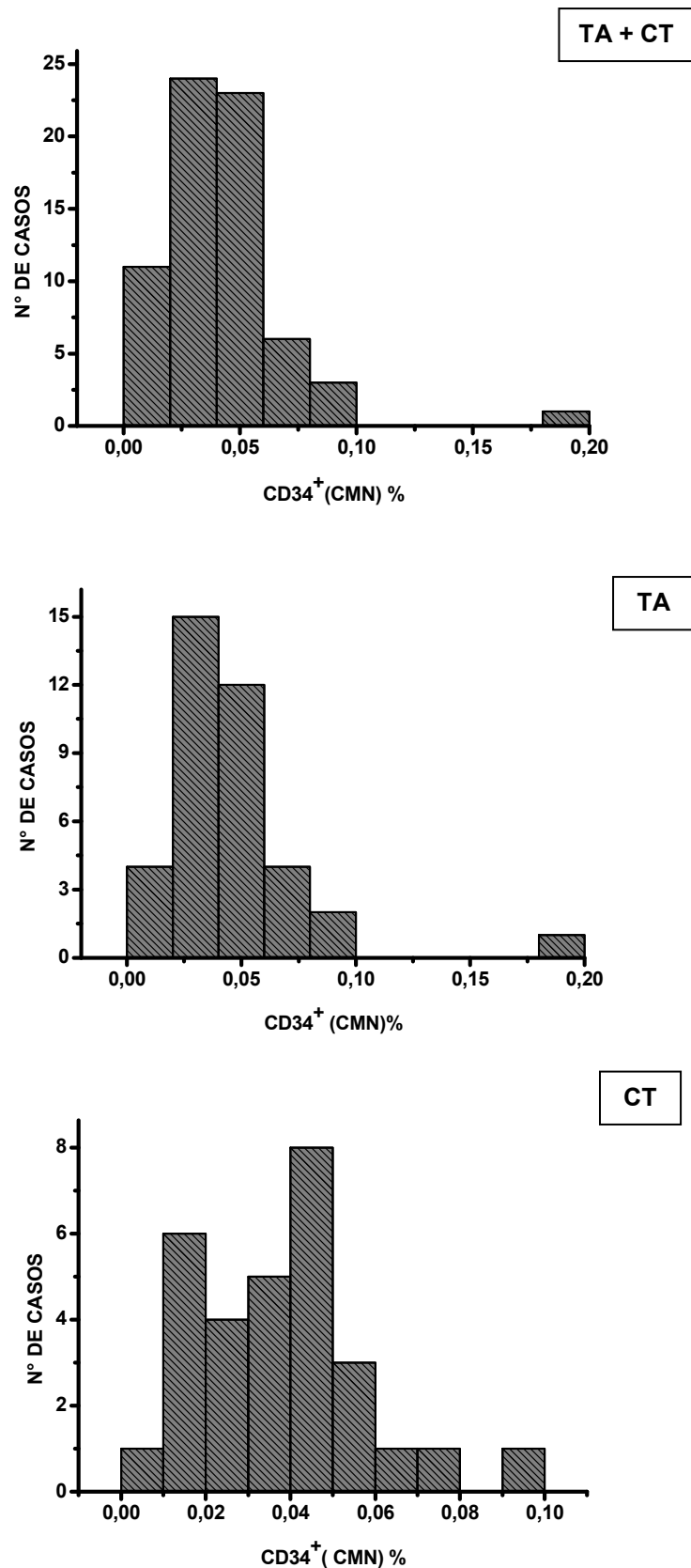


Figura 12: Distribuição dos níveis de células CD34⁺CD133⁺ (A) e CD34⁺KDR⁺ (B) de ambos os grupos (TA+CT, n = 68), controle (CT, n = 30), de treinamento aeróbico (TA, n = 38). CMN: células mononucleares.

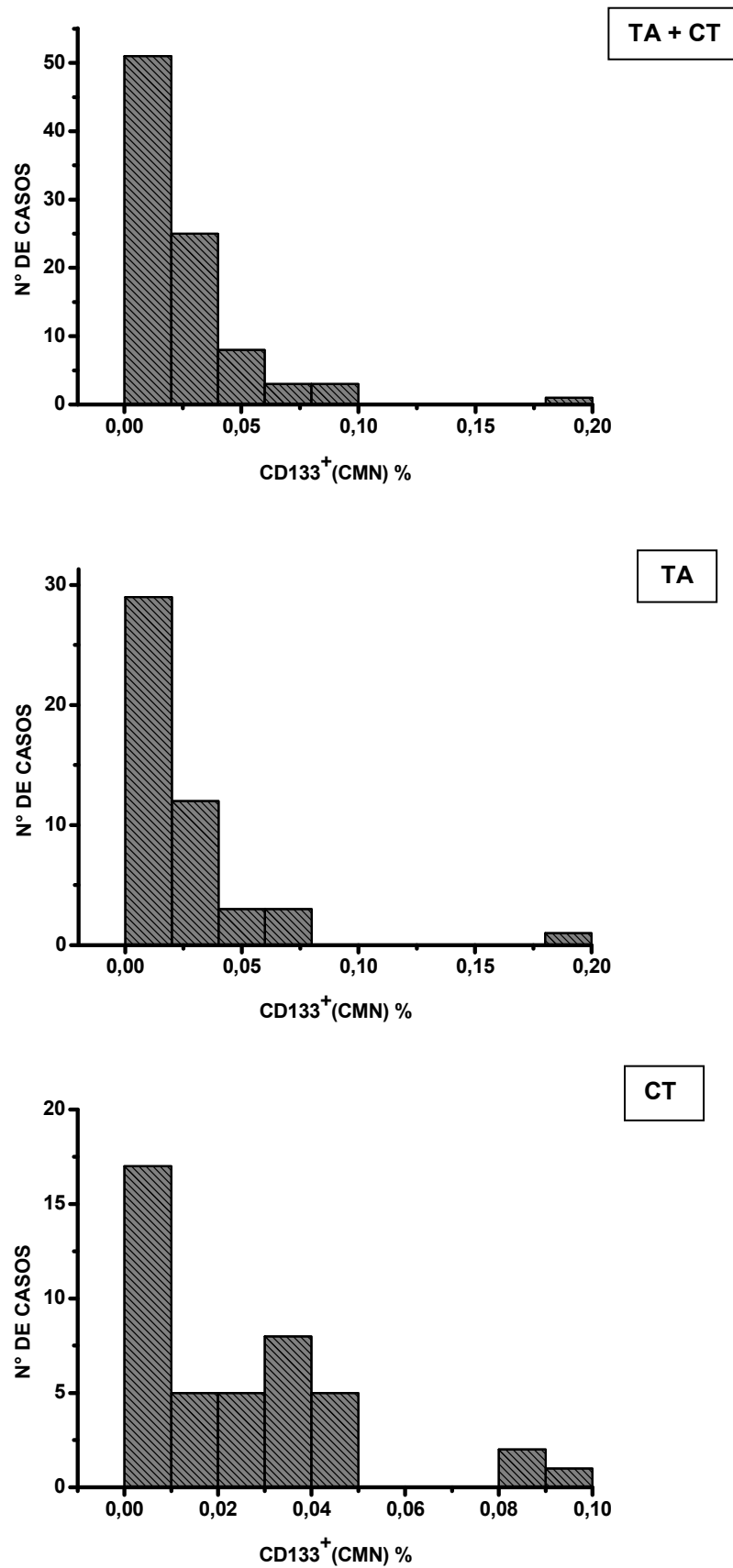


Figura 13: Distribuição dos níveis de células $CD34^+CD133^+$ (A) e $CD34^+KDR^+$ (B) de ambos os grupos (TA+CT, n = 68), controle (CT, n = 30), de treinamento aeróbico (TA, n = 38). CMN: células mononucleares.

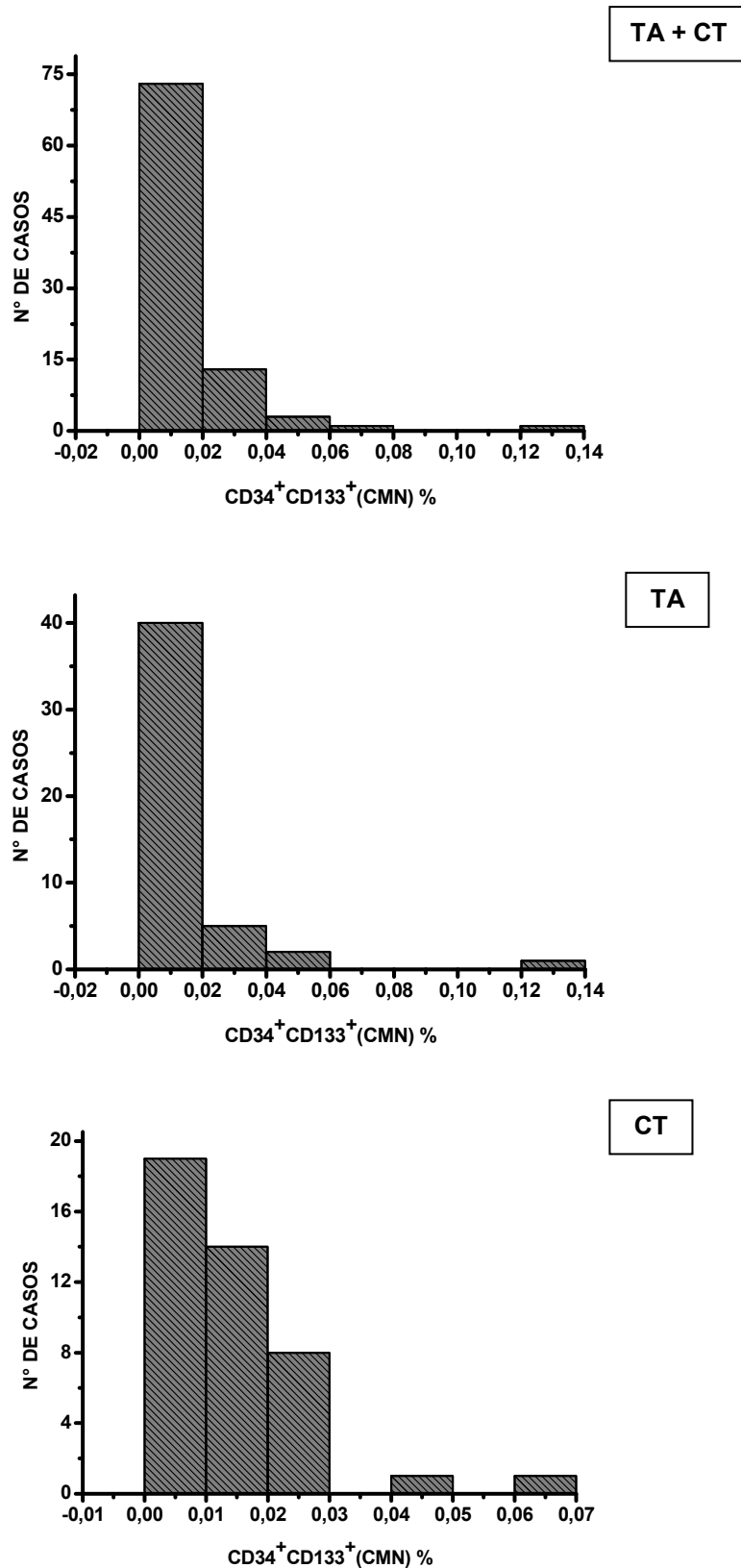


Figura 14: Distribuição dos níveis de células CD34⁺CD133⁺ (A) e CD34⁺KDR⁺ (B) de ambos os grupos (TA+CT, n= 68), controle (CT, n = 30), de treinamento aeróbico (TA, n = 38). CMN: células mononucleares.

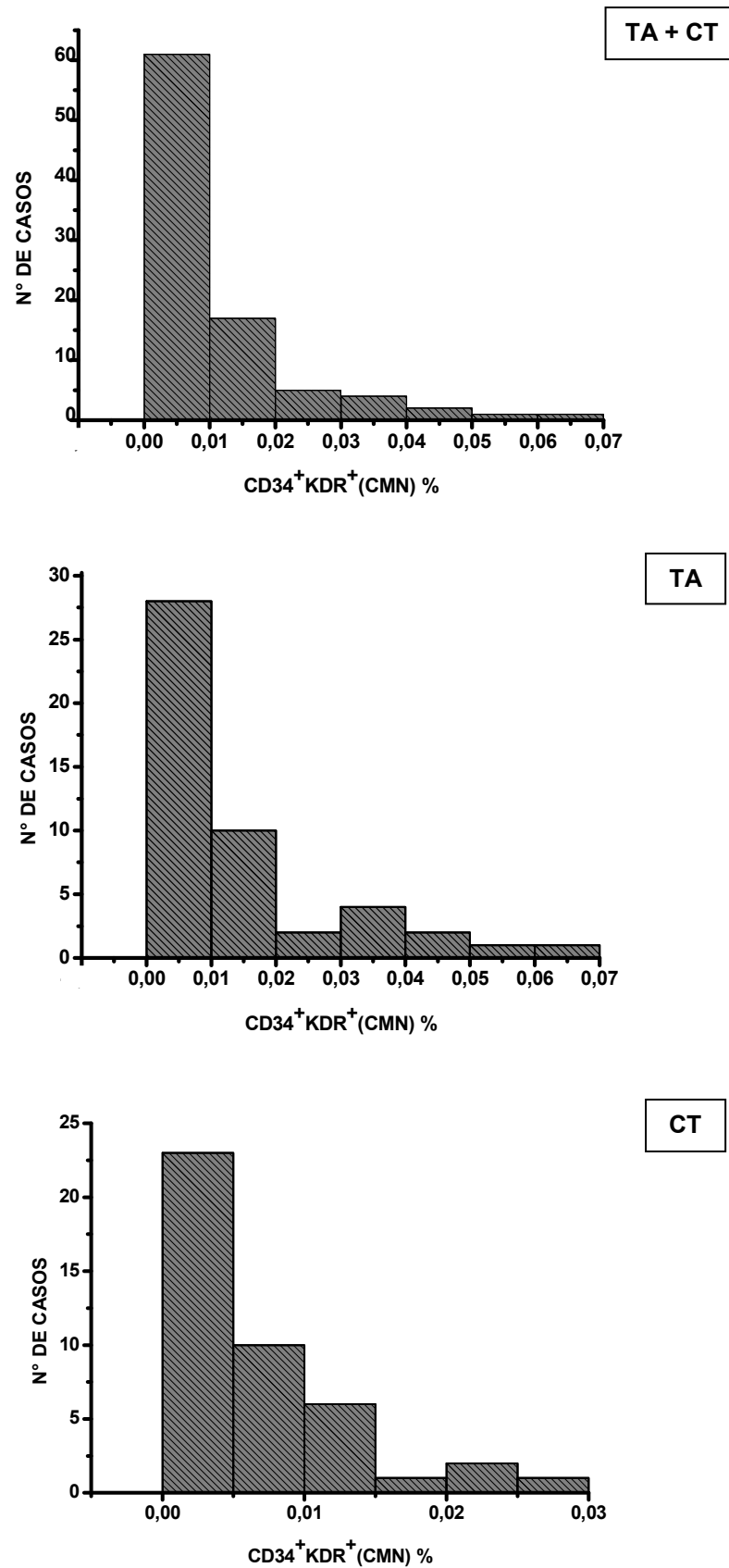


Figura 15: Distribuição dos níveis de células CD34⁺CD133⁺ (A) e CD34⁺KDR⁺ (B) de ambos os grupos (TA+CT, n = 68), controle (CT, n = 30), de treinamento aeróbico (TA, n = 38). CMN: células mononucleares.

4.4 Teste de Reprodutibilidade entre Ensaios

Como já apresentado na figura 8, o CD34⁺ foi utilizado em ambas as combinações de marcadores para identificação de CPC e EPC circulantes. Desta forma, a fim de se testar a reprodutibilidade entre ensaios para esta marcação, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (r), tendo sido observado forte grau de correlação em ambos os valores de porcentagem de eventos positivos em cada tubo de marcação como apresentado na figura 16.

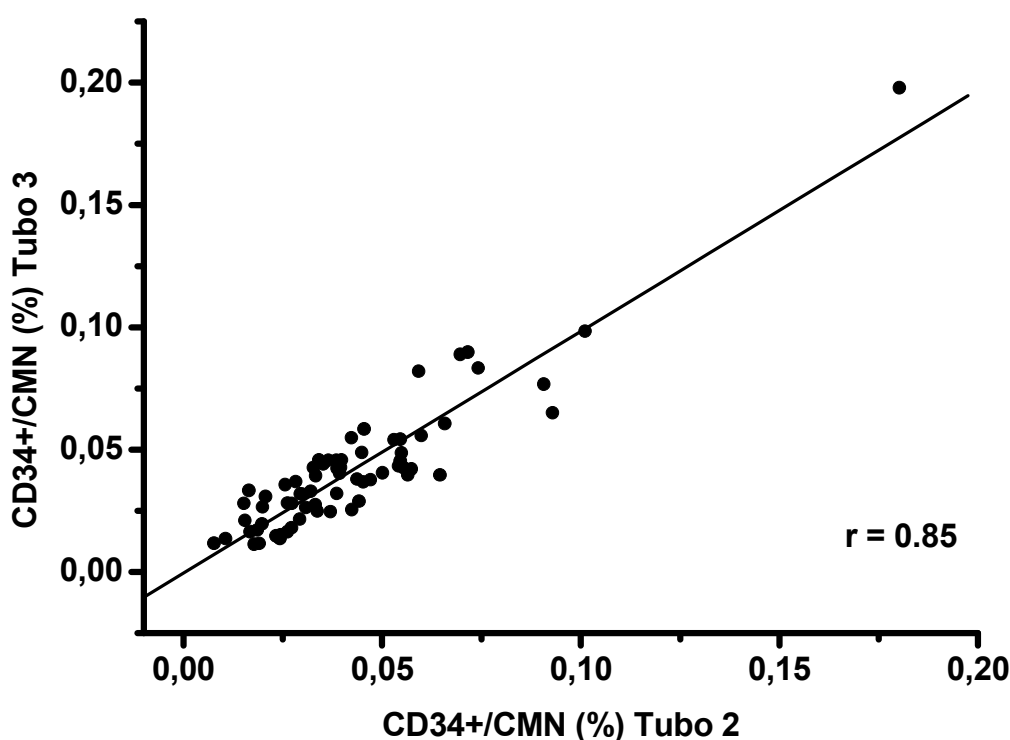


Figura 16: Correlação entre ensaios para marcação CD34+ nos tubos 2 e 3. CMN: células mononucleares.

4.5 Células Progenitoras Circulantes

Os níveis percentuais de células progenitoras CD34⁺ (CT: 0,0381 ± 0,0036 e TA: 0,0399 ± 0,0050, p = 0,63) e CD133⁺ (CT: 0,0308 ± 0,0043 e TA: 0,0199 ± 0,0052, p = 0,22) circulantes em sangue periférico foram similares entre os grupos controle e treinamento aeróbico, como mostra a figura 17.

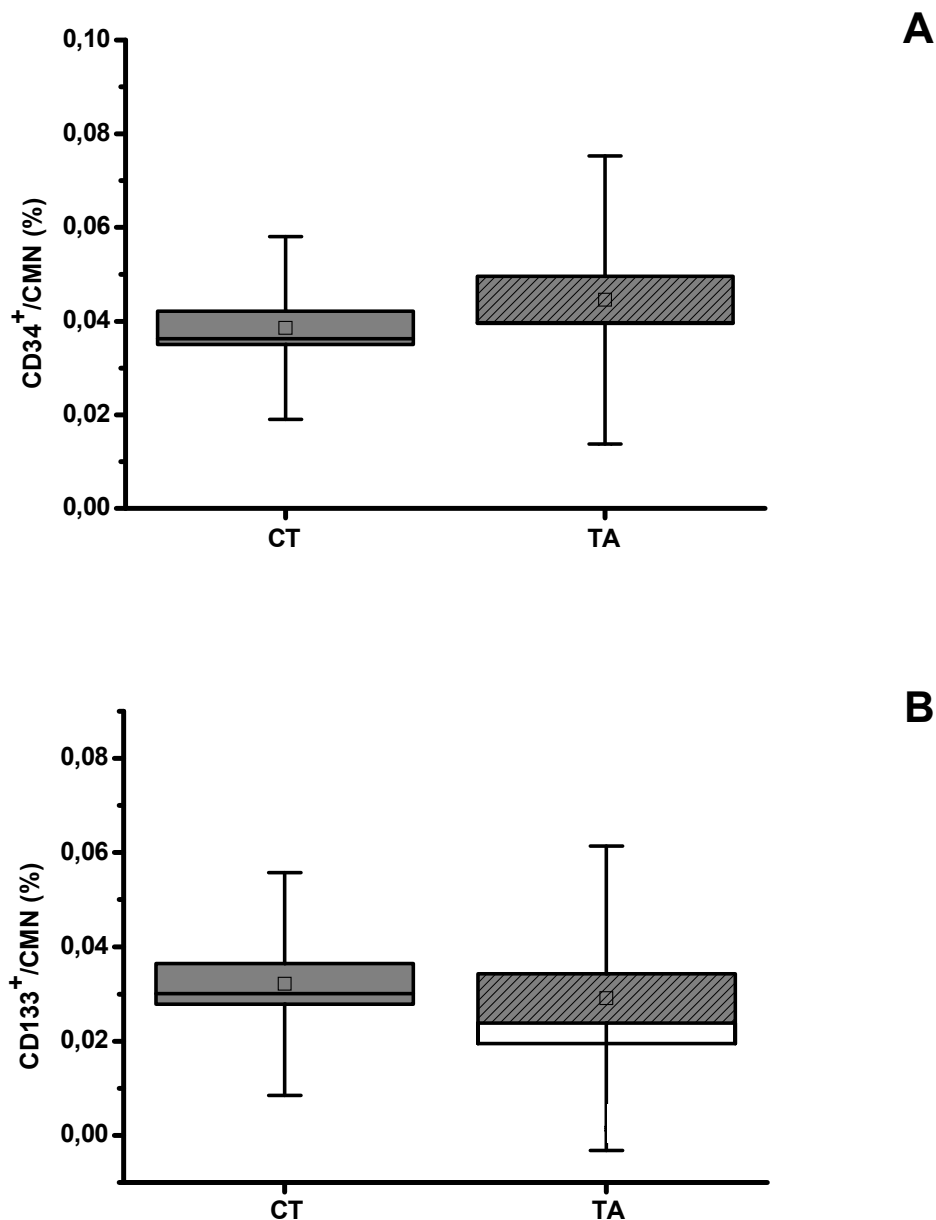


Figura 17: Níveis percentuais de células $CD34^+CD133^+$ (A) e células $CD34^+KDR^+$ (B) nos grupos controle (CT, n= 30), e de treinamento aeróbico (TA, n= 38). O box expressa o EPM, (\square) média, (—) mediana e extremidades o DP. CMN: células mononucleares.

A figura 18 representa os níveis percentuais das subpopulações celulares $CD34^+CD133^+$ e $CD34^+KDR^+$ circulantes em sangue periférico nos grupos de estudo. Observaram-se níveis similares de células $CD34^+CD133^+$ (CT: $0,0149 \pm 0,0024$ e TA: $0,0124 \pm 0,0033$, $p = 0,26$). Entretanto, o nível percentual da subpopulação de células $CD34^+KDR^+$ apresentou-se aumentado no grupo de treinamento aeróbico em relação ao grupo controle com uma tendência à significância estatística (CT: $0,0083 \pm 0,0012$ e TA: $0,0121 \pm 0,0025$, $p = 0,057$).

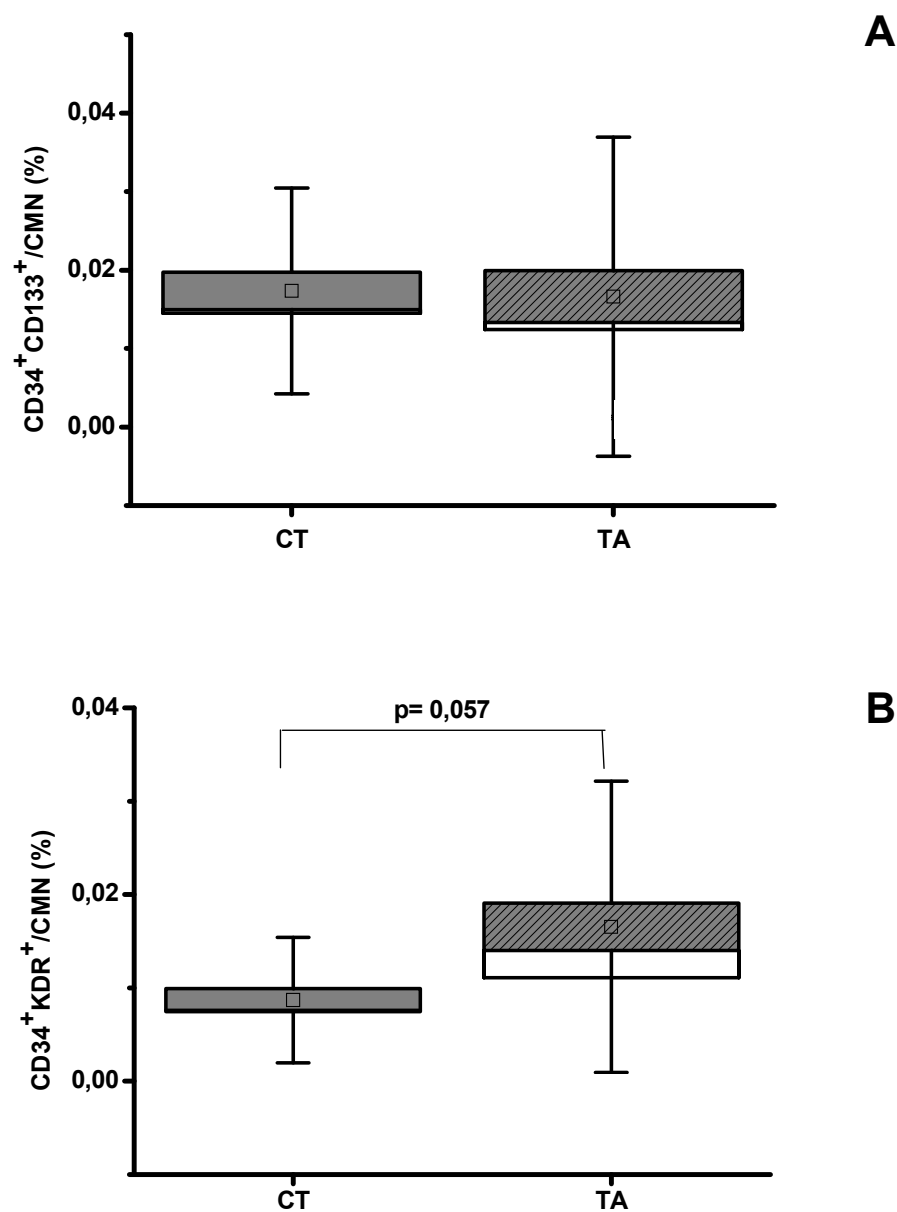


Figura 18: Níveis percentuais de células CD34⁺CD133⁺ (A) e células CD34⁺KDR⁺ (B) nos grupos controle (CT, n= 30), e de treinamento aeróbico (TA, n= 38). O box expressa o EPM, (□) média, (—) mediana e extremidades o DP. CMN: células mononucleares.

Devido à observada diferença estatística na idade entre os grupos CT e TA, foi realizada análise de correlação entre os níveis percentuais de células CD34⁺KDR⁺ e a idade dos indivíduos em cada grupo separadamente e juntos. A figura 19 mostra a correlação entre os níveis percentuais de células CD34⁺KDR⁺ e a idade dos indivíduos do grupo CT, TA e CT+TA. Nas três análises, utilizando coeficiente de Spearman (r), foi encontrada fraca correlação.

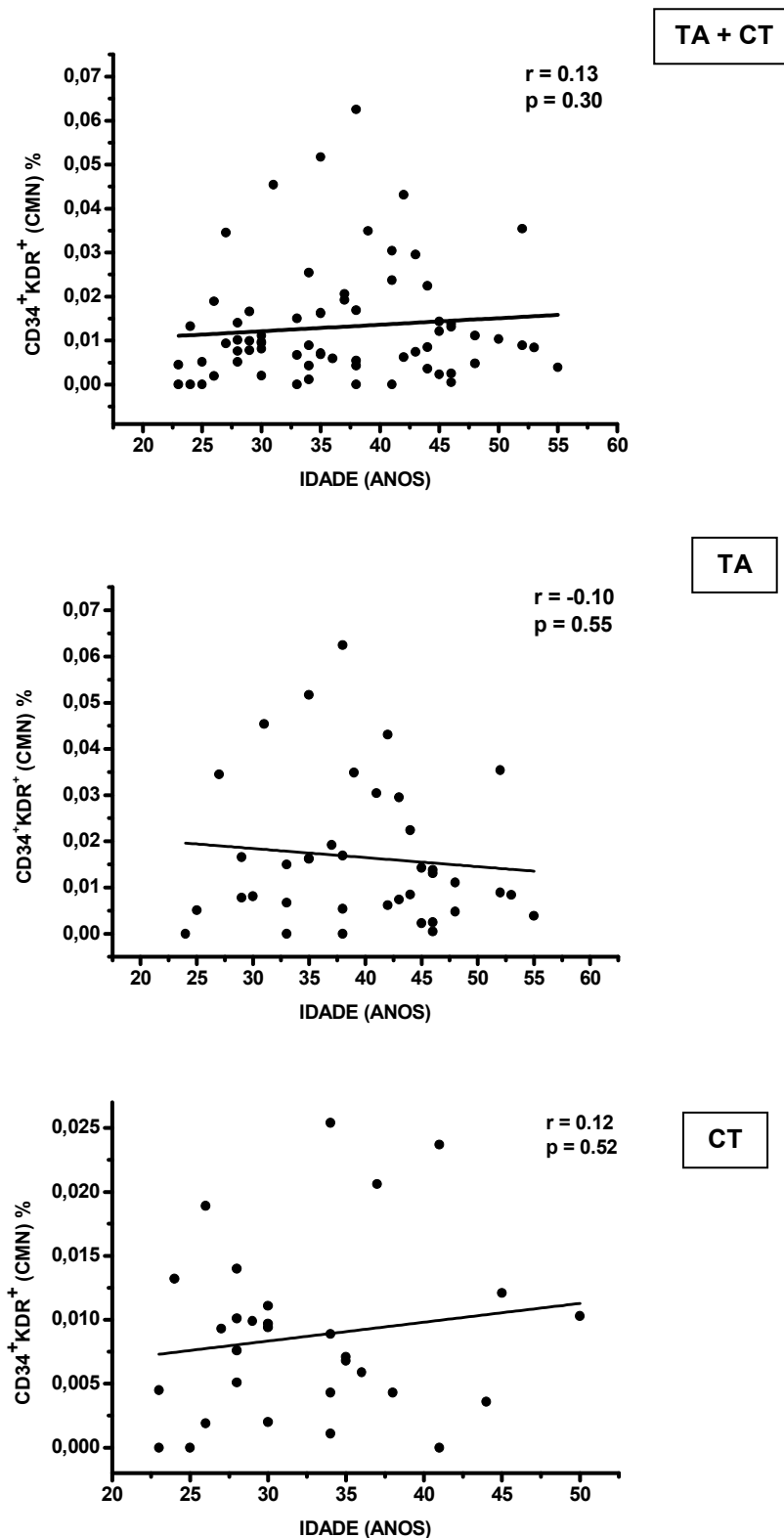


Figura 19: Correlação entre os níveis percentuais de células CD34⁺KDR⁺ e a idade dos indivíduos ambos os grupos (TA+CT, n = 68), controle (CT, n = 30), de treinamento aeróbico (TA, n = 38). CMN: células mononucleares.

4.6 Dilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial

A tabela 2 apresenta as medidas de diâmetro e fluxo sanguíneo da artéria braquial avaliadas por ultrassom vascular em repouso e após a oclusão transitória do antebraço. Foi observado aumento significativo de ambos os parâmetros após tal procedimento. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo CT e TA.

	Grupo Controle n=37	Treinamento Aeróbico n=45
Diâmetro Basal (mm)	4,11 ± 0,08	4,20 ± 0,07
Pico de Diâmetro (mm)	4,42 ± 0,09*	4,56 ± 0,07*
Δ Diâmetro Arterial (mm)	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,03
Fluxo Basal (cm/s)	69,43 ± 2,25	71,85 ± 2,21
Fluxo Após Oclusão (cm/s)	148,26 ± 3,58*	147,23 ± 3,24*

Tabela 2. Medidas da artéria braquial avaliadas por ultrassom vascular. Valores representados como média ± EPM. Diferença significativa com $P < 0,05$ com o basal (*).

A porcentagem de dilatação mediada por fluxo (% DMF) dependente de endotélio dos grupos TA e CT está representada na figura 20. Não foi observada diferença estatística significativa ($p = 0,19$) entre o grupo de treinamento aeróbico e controle.

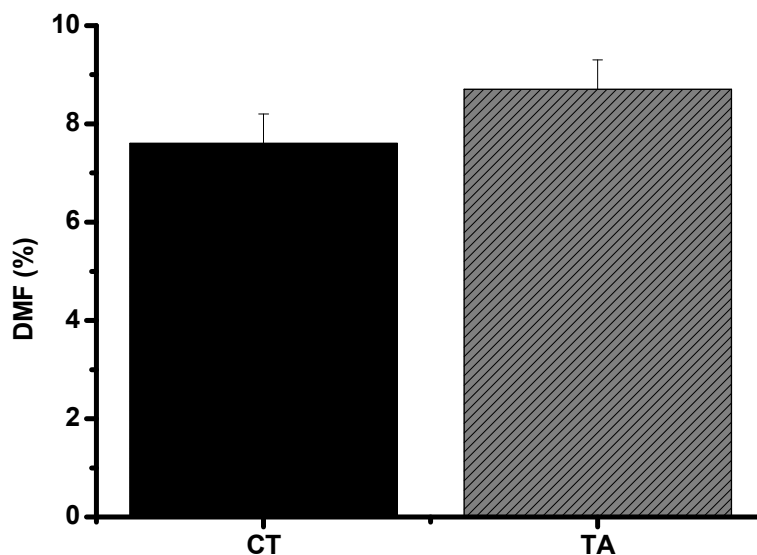


Figura 20: Dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial nos grupos controle (CT, $n = 37$) e de treinamento aeróbico (TA, $n = 45$).

A figura 21 mostra a correlação entre a % DMF e a idade dos indivíduos do grupo CT e TA e TA+CT. O coeficiente de Pearson (r) encontrado nas três análises mostrou fraca correlação entre estes parâmetros.

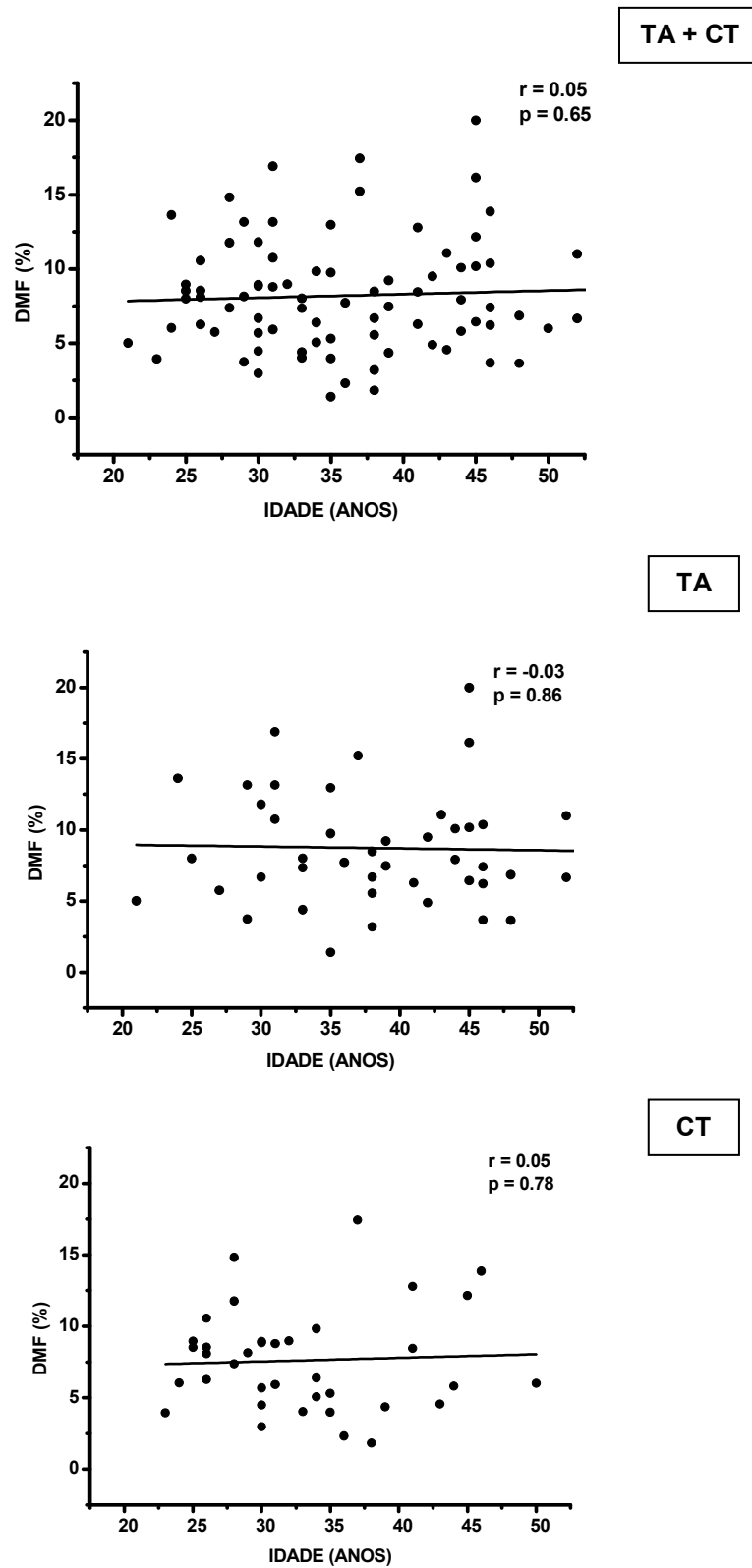


Figura 21: Correlação entre a porcentagem de dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial e a idade dos indivíduos de ambos os grupos (TA+CT, $n = 82$) controle (CT, $n = 37$) e de treinamento aeróbico (TA, $n = 45$). CMN: células mononucleares.

A figura 22 mostra uma fraca correlação entre os níveis de células $CD34^+KDR^+$ e os valores de %DMF da artéria braquial avaliada por coeficiente de Spearman (r) nos grupos CT, TA e TA+CT.

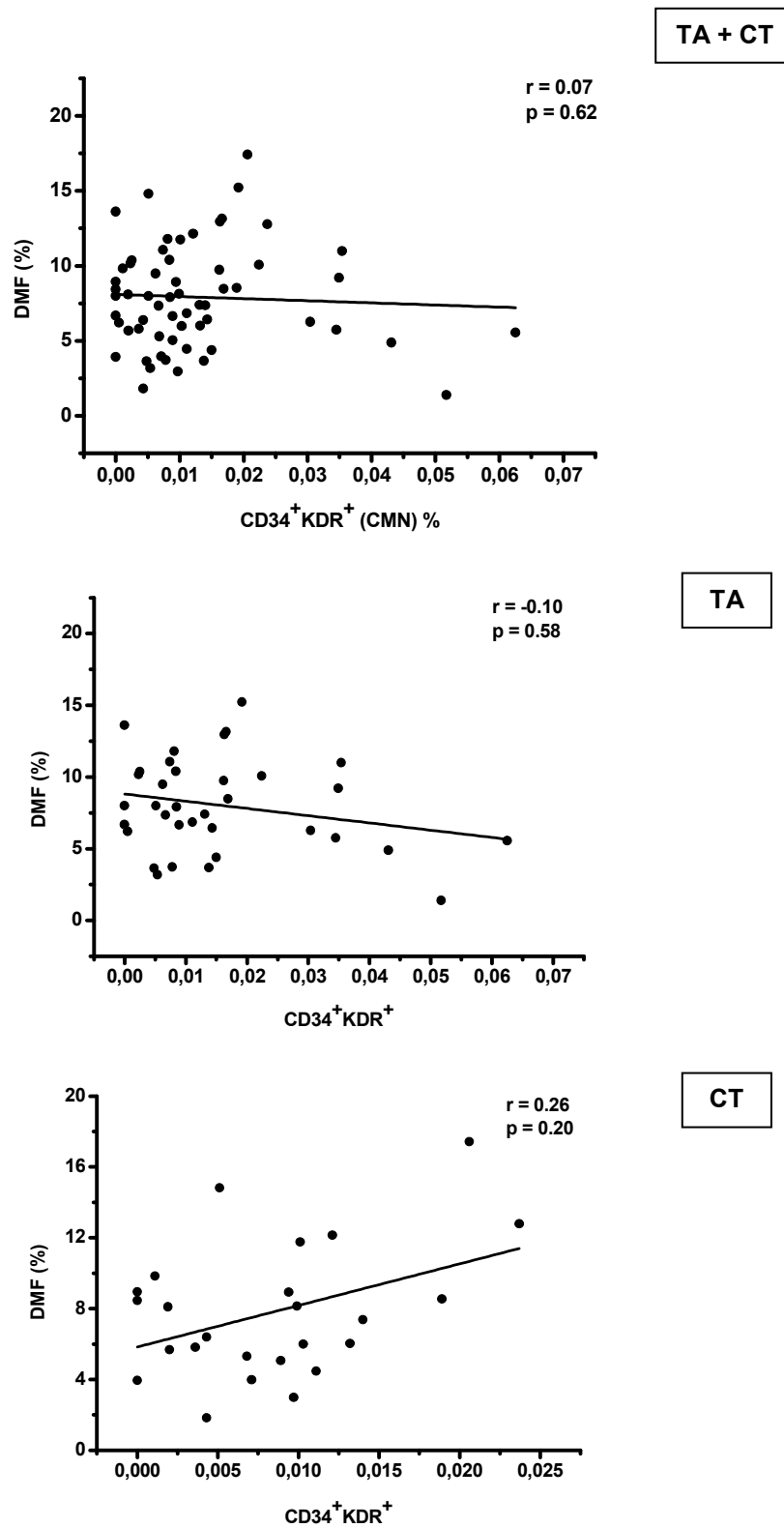


Figura 22: Correlação entre a porcentagem de dilatação mediada por fluxo (DMF) da artéria braquial e níveis de células $CD34^+KDR^+$ em ambos os grupos (TA+CT, $n = 60$), grupo controle (CT, $n = 25$), e treinamento aeróbico (TA, $n = 35$). CMN: células mononucleares.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A literatura descreve que o exercício físico regular e dinâmico está associado com redução de fatores de risco e da incidência de eventos cardiovasculares. Determina, por exemplo, uma distribuição mais favorável das lipoproteínas no sangue, aumentando o HDL colesterol, fato confirmado neste estudo. Em pacientes que já são portadores de doenças cardiovasculares, o exercício aeróbico regular também possui efeitos benéficos mais evidentes. Assim, melhora a função vascular de pacientes com DAC (Hambrecht, et al., 2000; Belardinelli, et al., 2001), insuficiência cardíaca crônica (Hambrecht, et al., 1998; Hornig et al., 2001) ou doença arterial periférica (Brendle, et al., 2001). O conhecimento e compreensão dos diversos mecanismos que determinam os efeitos benéficos do treinamento físico sobre o sistema cardiovascular, em especial sobre a função endotelial, poderiam ajudar na identificação de programas apropriados de exercício físico visando à reabilitação de doentes ou, até mesmo, a prevenção de doenças cardiovasculares em indivíduos saudáveis.

Estudos recentes mostram que CPCs provenientes da medula óssea são capazes de modular a função cardiovascular (Asahara et al., 1997). Em especial, um subconjunto destas células, denominado EPCs (Rafii & Lyden, 2003), promove reparo vascular, participa da angiogênese e melhora a função endotelial (Dimmeler et al., 2001; Hill, et al., 2003; Walter et al., 2002; Werner et al., 2003). Tanto o exercício de *endurance* agudo (Rehman et al., 2004), ou crônico (Laufs et al., 2004) são capazes de mobilizar células progenitoras em pacientes com fatores de risco para doenças cardiovasculares ou com patologia cardiovascular já manifesta. Contudo, os estudos analisando o impacto do exercício crônico sobre a quantificação das EPC's e sua correlação com a função endotelial na ausência de disfunção ou doença estabelecida ainda são relativamente escassos.

5.1 Principais Achados

Em nosso estudo avaliamos os níveis de CPCs e EPCs em sangue periférico de indivíduos praticantes por longo tempo de corridas de longa duração e comparamos os dados com um grupo controle de indivíduos sedentários saudáveis. A hipótese inicial a ser testada era que o exercício crônico de *endurance* aumentaria o número de CPCs e EPCs no sangue periférico. Adicionalmente verificamos se haveria associação entre os níveis de EPCs e a função endotelial avaliada pela DMF na artéria braquial.

Os achados mais importantes do nosso trabalho foram: 1) detectamos apenas tendência à elevação das EPCs CD34⁺KDR⁺ nos corredores, em detrimento das CPCs; 2) correlação fraca entre os níveis percentuais destas células no sangue periférico com a função endotelial; 3) valores similares de %DMF entre corredores e sedentários.

5.2 Parâmetros Bioquímicos

Alguns indicadores bioquímicos de aptidão adquirida com exercícios de *endurance* foram levantados nos dois grupos, visando determinar se o grupo TA se diferenciava do grupo CT. É amplamente aceito que o exercício físico aeróbico está associado com um perfil lipídico e lipoproteico menos aterogênico e, conseqüentemente, com uma redução do risco cardiovascular. Observamos clara e importante elevação da lipoproteína HDL no grupo treinado com exercício aeróbico em detrimento das outras frações de colesterol. Isso corrobora os achados na literatura mostrando associação da atividade física com maiores níveis de HDL colesterol em homens e mulheres saudáveis (Haskell, 1984; Durstine & Haskell, 1994; Brites et al., 2004).

A medida da atividade de enzimas musculares como a creatina-quinase (CK) permite obter informações sobre o *status* do tecido muscular e do treinamento físico. Os níveis séricos de CK total em indivíduos saudáveis são frequentemente usados como marcadores de lesão muscular. Particularmente em atletas, o estudo de CK tanto em repouso quanto após uma sessão de exercício poderia ser uma importante ferramenta clínica. Entretanto, seu valor

isolado como marcador é questionável. Variações na atividade de CK diferem marcadamente de acordo com as condições de realização do exercício, carga de esforço, intensidade, duração, bem como do histórico de treinamento e de características físicas individuais (Brancaccio et al., 2007).

Kratz et. al (2002) relatam que o treinamento de *endurance* pode resultar em elevação persistente de CK. Ainda, dados já descritos na literatura mostram que atletas possuem maiores níveis de CK em relação a indivíduos não treinados (Hortobagyi & Denhan, 1989; Fallon et al., 1999), fato que também foi detectado em nosso estudo, onde o grupo TA apresentou níveis séricos maiores tanto de CK total quando da fração CK-MB. Vale ressaltar que todos os participantes estavam em repouso e com treinamento interrompido por, pelo menos, 24 horas antes da coleta de sangue. Assim, nossos achados são concordantes com aqueles de Kratz et al. (2002) e de França et al. (2006) que mostram uma elevação persistente dos níveis de CK total e CK-MB por pelo menos 24 horas após maratona. Na coleta de sangue, entretanto, não foi verificada quando teria sido a última sessão e nem qual a sua intensidade. Entretanto, os participantes do grupo TA realizam sessões de corrida superiores a 15 km, pelo menos 3 vezes por semana, o que leva a crer que os níveis elevados de CK e CK-MB indiquem que os indivíduos estavam em período de treinamento e que as enzimas séricas indicariam essa situação.

A isoenzima MB é considerada um confiável marcador de necrose miocárdica, oferecendo considerável sensibilidade para prever piora no prognóstico em pacientes infartados (Rajappa & Sharma, 2005; Galla et al., 2006). Apesar de o presente trabalho encontrar aumento desta fração de CK, o diagnóstico de dano cardíaco em corredores de longa distância é complexo não deve ser feito sem que haja correlação entre os dados enzimáticos e o quadro clínico, como sugerido por Brancaccio et al. (2007). Dessa forma, a análise de enzimas indicadoras de dano miocárdico deve ser feita com cautela em atletas em treinamento ou nos períodos pós-competição. Estes dados bioquímicos asseguram que o grupo TA era composto de indivíduos que apresentavam marcadores indiretos de treinamento aeróbico prolongado e de moderada a alta intensidade.

5.3 Células Progenitoras Circulantes

Neste estudo avaliamos, em indivíduos praticantes de corridas de longa duração e sedentários saudáveis, diferentes populações de células progenitoras circulantes com base em seus marcadores de superfície celular: CD34⁺, marcador de células tronco hematopoiéticas com origem na medula óssea (Bonsignore et al., 2002); CD133⁺, um marcador utilizado para isolar subpopulações de células progenitoras (Gehling, 2000) e as subpopulações: CD34⁺CD133⁺ e CD34⁺KDR⁺, consideradas como CPCs e EPCs respectivamente. Tais denominações utilizadas neste trabalho foram baseadas em caracterizações prévias e já descritas na literatura (Asahara et al., 1997; Thijssen et al., 2006; Möbius-Winkler et al., 2009; Fadini et al., 2010).

A verificação dos níveis percentuais destas células em sangue periférico por citometria de fluxo é amplamente utilizada dada à praticidade, rapidez e riqueza de dados oferecidos pela técnica. Apesar disto, uma importante limitação para este estudo reside na grande dispersão de valores encontrados entre indivíduos (Laufs, 2005; Thijssen et al., 2006; Witkowski et al., 2010), o que dificulta a comparação de valores em diferentes populações.

Em nosso estudo, os níveis de CPCs e EPCs foram apresentados como porcentagem de eventos positivos em CMN, conforme descrito anteriormente (Schmidt-Lucke, 2005). Estes dados não apresentaram distribuição normal. Nossos resultados concordam o trabalho de Arao e colaboradores (2010) que apresentam histograma de distribuição de contagem celular de CD34⁺CD133⁺ (células/ μ L) similar aos encontrados em nosso estudo.

Dentre as populações de CPCs e EPCs quantificadas no presente trabalho, apenas os níveis de células CD34⁺KDR⁺ foram maiores no grupo TA em relação ao grupo CT. Dada a grande dispersão dos dados, o teste de significância estatística mostrou apenas tendência na ocorrência desta diferença ($p= 0,057$). Considerou-se tal aumento como relevante tendo em vista o pequeno tamanho da amostra estudada. Esse achado sugere que o treinamento físico possa facilitar distintamente a liberação de linhagens e populações de células progenitoras derivadas da medula óssea, levando a um aumento detectável no sangue periférico. O papel fisiológico das EPCs em no treinamento físico é especulativo. Nós sugerimos que o aumento na quantidade

apenas de EPCs observado nos corredores em relação aos sedentários saudáveis seja uma adaptação ao exercício de longa duração, possivelmente relacionado à formação de novos vasos na musculatura ativa.

A comparação de nossos achados com os de outros autores não é simples porque o número de trabalhos publicados ainda é relativamente pequeno e as medidas são feitas em populações diversas. Além disso, utilizam diferentes tipos de marcadores e metodologias para definir tal população de células, o que leva muitas vezes à dificuldade de interpretação de dados, criando obstáculos para comparação direta entre laboratórios, levando a resultados não superponíveis.

É de nosso conhecimento e já comentado anteriormente, que, muitos grupos de estudo nesta área dedicam-se a investigar intervenções de exercício com sessões agudas ou de treinamento físico em indivíduos com doenças vasculares já estabelecidas. Adams (2004), por exemplo, mostrou aumento tempo dependente de EPCs CD34⁺KDR⁺ circulantes e em cultura avaliados em pacientes com DAC submetidos a uma sessão isolada de teste de esforço máximo. Paul et al. (2007) mostrou aumento de células CD133⁺KDR⁺ em cultura de 50 pacientes com DAC e submetidos a programa de reabilitação cardiovascular.

Em indivíduos saudáveis sedentários, o exercício agudo de *endurance* promoveu significativo aumento de EPCs CD34⁺KDR⁺ circulantes (Van Craenenbroeck et al., 2008). E, o treinamento aeróbico foi capaz de elevar EPCs em cultura (Hoetzer, 2007). Este último trabalho ainda sugere que o exercício aeróbico realizado de forma regular seria uma efetiva intervenção capaz de melhorar a capacidade migratória destas células tanto em adultos de meia idade, quanto em idosos.

Em condições de exercício extremo, como de corridas de longa duração, pouco se conhece o perfil de EPC's e alguns dados da literatura são discordantes. Goussetis e colaboradores (2009) investigaram a cinética de liberação destas células para o sangue periférico, e o comportamento em cultura celular, em atletas de *endurance* de meia-idade, antes, ao final e 48 horas após corrida contínua de 246 km. Foi observado incremento de até 11 vezes de EPCs por mL de sangue, valor que se manteve durante as 48 horas pós-corrida. Mas, em relação aos níveis basais destas células, não foi

encontrada diferença significativa entre os atletas e grupo controle sedentário. Já Adams et al. (2008) não encontraram diferença nos níveis de EPCs CD133⁺KDR⁺ em sangue periférico avaliadas por citometria de fluxo em corredores com idade de aproximadamente 60 anos, comparando as medidas antes e após maratona. Observaram até mesmo redução de células CD34⁺ na medida pós-corrída. Entretanto, Bonsignore et al. (2010) observaram níveis de células CD34⁺ e células CD133⁺ inalterados após a maratona em corredores de meia-idade.

Da mesma forma que em condições extremas, resultados de estudos que avaliam o número EPCs, em repouso, após treinamento físico em humanos não são consistentes.

Witkowski e colaboradores (2010), ao comparar níveis basais de células CD34⁺ e CD34⁺KDR⁺ em indivíduos treinados com exercício de *endurance* por pelo menos 30 anos com controles saudáveis de similar idade (~ 60 anos), não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Ainda neste trabalho, a avaliação de EPCs por cultura celular, semelhante aos resultados acima, também não apresentou diferença significativa entre os grupos.

As explicações para tais discrepâncias entre os diferentes estudos e também em relação aos nossos resultados podem decorrer de vários fatores: 1) utilização de diferentes metodologias aplicadas para avaliação de EPCs, além de ainda não existir uma definição clara dos marcadores que identifiquem com precisão essa população de células; 2) as diferenças de idade dos indivíduos estudados. Já é descrito na literatura que o declínio na função e biodisponibilidade de EPCs circulantes contribuem etiologicamente para disfunção vascular relacionada com a idade (Dimmeler & Vasa-Nicotera, 2003; Heiss et al., 2005). Em contraste, o exercício aeróbico regular está associado com redução de doença cardiovascular especialmente em idosos e adultos de meia-idade (Blair et al., 1989; Powell et al., 1987; Bauman, 2004) e tem se apresentado como uma estratégia para melhorar a capacidade migratória de EPCs (Hoetzer et al., 2007).

No presente trabalho, como apresentado na tabela 1, tivemos pequena diferença de idade dos grupos estudados, sendo o grupo TA, em média, 3 anos mais velho do que o grupo CT (TA: 39 ± 1 e CT: 33 ± 1 anos). Portanto, essa

diferença de idade poderia ser uma das limitações do nosso estudo, tendo em vista os efeitos da idade sobre a função vascular e sobre a mobilização de células progenitoras derivada da medula óssea. Todavia, não encontramos correlação importante entre os níveis de EPCs $CD34^+KDR^+$ e a idade dos participantes do estudo. Portanto, seria pouco provável que as diferenças entre os grupos estejam sendo influenciadas pela diferença de idade.

Com relação aos mecanismos moleculares de regulação com os quais ocorre a mobilização de EPCs induzida pelo exercício físico, evidências relatam que existem diferentes mecanismos no exercício agudo e no exercício crônico. No primeiro, a geração de ROS através da NADPH oxidase (balanceada adequadamente pelo sistema antioxidante) parece desencadear a mobilização destas células da medula óssea (Moebius-Winkler et al., 2010). Já no treinamento físico crônico, a eNOS desempenha papel central no aumento de EPCs mediado pelo exercício. Isso foi inicialmente documentado por Laufs e colaboradores (2004) em que o aumento, induzido pelo treinamento, de EPCs $Sca-1^+KDR^+$ foi bloqueado em animais *knockout* para eNOS. Além disso, Paul et al. (2007) observaram que o programa de reabilitação cardíaca em pacientes com DAC aumentou o número, sobrevivência e potencial de diferenciação endotelial de EPCs associados com um aumento de óxido nítrico no sangue. Associado a tais mecanismos, o impedimento do estresse oxidativo representa outro fator envolvido na regulação da atividade endotelial relacionada ao exercício, visto que o excesso de ROS é tóxico para EPCs (Yao & Fukuda, 2006).

5.4 Dilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial

A valorização do papel central do endotélio no processo aterosclerótico levou ao desenvolvimento de novos métodos para testar diferentes aspectos de sua função. O que forneceu uma oportunidade clínica de se detectar doença vascular precocemente, quantificar riscos em indivíduos aparentemente saudáveis, e até mesmo investigar efeitos de diferentes intervenções, como é o caso do treinamento físico, sobre a função vascular.

A função endotelial pode ser avaliada clinicamente tanto na circulação coronariana como na circulação periférica por monitoramento da vasodilatação produzida por administração de agonistas dependentes de endotélio, como a acetilcolina, ou pela vasodilatação mediada por fluxo. A técnica de DMF avaliada por ultrassom foi desenvolvida para facilitar a obtenção de medidas repetidas, uma vez que o método é não invasivo (Celermajer et al., 1992; Sorensen et al., 1995; Voguel, 2001). Este método é tecnicamente exigente, mas pode ser padronizado para gerar resultados reprodutíveis que se correlacionam com a função vascular coronariana (Corretti et al., 2002; Anderson et al., 2006).

O exercício aeróbico melhora a DMF em presença de insuficiência cardíaca crônica (Hornig et al., 1996), DAC (Kuvin et al., 2001), e fatores de risco como hipertensão arterial (Higashi et al., 1999) e diabetes (Maiorana et al., 2001). Entretanto, o conhecimento da influência do treinamento aeróbico, a longo prazo, em indivíduos saudáveis ainda não está claro. Rinder e colaboradores (2000) avaliaram por DMF da artéria braquial, a função endotelial de atletas de *endurance* idosos (~ 68 anos). Neste estudo foi observada melhor resposta durante a hiperemia reativa em relação aos indivíduos sedentários saudáveis, sugerindo que a diminuição da DMF relacionada com a idade é potencialmente reversível ou evitável pelo treinamento aeróbico de longa duração. Corroborando esses dados, DeSouza et al. (2000) em estudo transversal com atletas corredores jovens (~ 28 anos) e idosos (~ 63 anos), mostraram que os indivíduos treinados não apresentam redução da vasodilatação dependente de endotélio relacionada com a idade, avaliada por pletismografia com doses crescentes de acetilcolina quando comparados a indivíduos sedentários. Além disso, não foi observada diferença significativa na resposta vascular à acetilcolina entre atletas jovens e sedentários. Resultados similares foram encontrados pelo grupo de Galletta et. al. (2006) em corredores de longa distância em avaliação da vasodilatação dependente de endotélio utilizando a mesma técnica. Os indivíduos jovens treinados tiveram efeitos similares de dilatação pela acetilcolina quando comparados aos sedentários. Já os atletas idosos mostraram maior resposta à infusão de acetilcolina quando comparados com indivíduos sedentários de similar idade, sugerindo novamente que, o treinamento físico regular seja

capaz de atenuar a redução da vasodilatação dependente de endotélio relacionada à idade.

Na avaliação da função endotelial por DMF da artéria braquial foi encontrada resposta similar no percentual de DMF entre os grupos. Nossos dados corroboram os dados de DeVan e colaboradores, recentemente publicado (2011), em que não foi encontrada diferença significativa no percentual de DMF entre indivíduos com treinamento aeróbico e sedentários, jovens (~ 25 anos) e adultos de meia-idade (~ 50 anos). A redução da função endotelial com o avançar da idade já é bem descrita na literatura. Contudo, mesmo apresentando diferença estatisticamente significativa na idade de nossa população estudada, não encontramos correlação importante entre o percentual de DMF e a idade, já que nossa população, tanto do grupo TA como CT são adultos jovens e de meia-idade (21-58 anos).

5.5 Células Progenitoras Endoteliais e Dilatação Mediada por Fluxo

O papel das EPCs na função cardiovascular tem sido investigado ao longo de anos, e sua relação com a função endotelial é demonstrada na vasculatura coronária de pacientes com DAC (Werner et al., 2007). Entretanto, existem poucos resultados *in vivo* mostrando a relação entre o número de células CD34⁺KDR⁺ na circulação periférica e a medida de função vascular em indivíduos saudáveis. Murphy et al. (2007), avaliando indivíduos jovens saudáveis sul-asiáticos e caucasianos, observaram uma redução na resposta da DMF nos primeiros, visto que nesta população já é bem documentada presença de resistência à insulina, o que está associada à presença de disfunção endotelial. Além disso, esse grupo mostrou que o número de EPCs CD34⁺KDR⁺ foi um forte preditor para DMF.

No que diz respeito aos efeitos no treinamento físico, Witkowski e colaboradores (2010) utilizaram o aumento do fluxo sanguíneo do antebraço em resposta à hiperemia reativa como medida de função vascular, em atletas idosos. Tal resposta foi maior nos atletas em relação aos sedentários, confirmando os achados na literatura de que o treinamento físico melhora a disfunção endotelial associada ao envelhecimento. Além disso, observaram

que a variação percentual nos níveis de EPCs, com um destreino rápido de 10 dias, se correlacionou significativamente com a medida de função endotelial. Concordando com o papel destas células na manutenção da saúde vascular.

Em nosso estudo não foi observado correlação importante entre os níveis de EPCs e a medida de função endotelial por DMF. É possível que a utilização de uma população saudável, que ainda não apresente sinais claros de disfunção endotelial, ausência de doença cardiovascular manifesta, e de “não idosos”, poderiam explicar a medida de função endotelial similares entre os grupos TA e CT e a sua não correlação com EPCs.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Concluimos com esse estudo que os níveis de CPCs CD34⁺, CD133⁺ e CD34⁺CD133⁺ em sangue periférico total de indivíduos praticantes de corridas de longa duração foram similares aos de sedentários saudáveis. Apenas EPCs CD34⁺KDR⁺ apresentaram níveis circulantes maiores com tendência à significância estatística nos primeiros. Além disso, não observamos correlação entre os níveis de EPCs com melhora da função endotelial avaliada por dilatação mediada por fluxo, sendo que essa medida em valores percentuais apresentou-se semelhante entre os grupos. Acreditamos que os resultados encontrados neste trabalho são em virtude da população estudada ser saudável, não apresentando disfunção endotelial relacionada à presença de doença vascular, fatores de risco cardiovascular ou senilidade.

Referências

7. REFERÊNCIAS

Adams V, Challan GA, Zuba-Surma E, Ulrich H, Vereb G, and Tarnok A. Where new approaches can stem from: focus on stem cell identification. *Cytometry* 2009; 75 (1): 1-3.

_____, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmerich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24 (4): 684-690.

_____, Linke A, Breuckmann F, Leineweber K, Erbs S, Krankel N, Brocker-Preuss M, Woitek F, Erbel R, Heusch G, Hambrecht R, Schuler G, Mohlenkamp S. Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; 15 (5): 602-607.

_____, _____, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Mobius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111 (5): 555-562.

Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager M.A., Selwyn A.P., and Ganz P. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75 (6): 71B–74B.

_____, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26 (5): 1235–1241.

Arao K, Yasu T, Ohmura N, Tsukamoto Y, Murata M, Kubo N, Umemoto T, Ikeda N, Ako J, Ishikawa SE, Kawakami M, Momomura S. Circulating

CD34+/133+ progenitor cells in patients with stable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Circ J* 2010; 74 (9): 1929-1935.

Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287 (3): C572 – 579.

_____, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275 (5302): 964 –967.

_____, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18 (14): 3964-3972.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 1994; 16 (12): 901-906.

Bahlmann FH, deGroot KD, Mueller O, Hertel B, Haller H, Flisser D. Stimulation of endothelial progenitor cells. A new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45 (4): 526–9.

Barrett AJ, Longhurst P, Sneath P, Watson JG. Mobilization of CFU-C by exercise and ACTH induced stress in man. *Exp Hematol* 1978; 6 (7): 590-594.

Belardinelli R, Paolini I, Cianci G, Piva R, Georgiou D, Purcaro A. Exercise training intervention after coronary angioplasty: the ETICA trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37(7): 1891–1900.

Blair SN, Kampert JB, Kohl HW III, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA* 1996; 276 (3): 205–210.

Bonsignore MR, Morici G, Santoro A, Pagano M, Cascio L, Bonanno A, Abate P, Mirabella F, Profita M, Insalaco G, Gioia M, Vignola AM, Majolino I, Testa U, Hogg JC. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol* 2002; 93 (5): 1691-1697.

_____, _____, Riccioni R, Huertas A, Petrucci E, Veca M, Mariani G, Bonanno A, Chimenti L, Gioia M, Palange P, Testa U. Hemopoietic and angiogenetic progenitors in healthy athletes: different responses to *endurance* and maximal exercise. *J Appl Physiol* 2010; 109 (1): 60-67.

Booth FW, Gordon SE, Carlson CJ, Hamilton MT. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol*. 2000; 88 (2): 774–787.

Brancaccio P, Maffulli N, Limongelli FM. Creatine Kinase monitoring in Sport medicine. *Br Med Bull* 2007; 81-82: 209-230.

Brendle DC, Joseph LJ, Corretti MC, Gardner AW, Katzel LI. Effects of exercise rehabilitation on endothelial reactivity in older patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol* 2001; 87 (3): 324-329.

Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shephard RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med* 1998; 19 (2): 130-143.

Brites F, Verona J, De Geitere C, Fruchart JC, Castro G, Wikinski R. Enhanced cholesterol efflux promotion in well-trained soccer players. *Metabolism* 2004; 53 (10): 1262-1267.

Carmeliet P. Angiogenesis in healthy and disease. *Nature Medicine* 2003; 9: 653-660.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in

children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340 (8828): 1111–1115.

Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, and Murohara T. Mechanisms Underlying the Impairment of Ischemia-Induced Neovascularization in Matrix Metalloproteinase 2-Deficient Mice. *Circ Res* 2007; 100 (6): 904-913.

Chironi G, Walch L, pernollet MG, Gariepy J, Levenson J, Rendu F, Simon A. Decreased number of circulating CD34⁺KDR⁺ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2007; 191 (1): 1151-20.

Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubbe M, World M, Deanfield JE. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33 (5): 1379-1385.

Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995; 92 (11): 3337-3349

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39 (2): 257–265.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessel in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86(1): 228 –234.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: A question of balance 1995; *FEBS Lett.* 369 (2-3): 131-135.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and Dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007; 115 (10): 1285-1295.

DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*. 2000; 102(12): 1351-7.

DeVan AE, Umpierre D, Harrison ML, Lin HF, Tarumi T, Renzi CP, Dhindsa M, Hunter SD, Tanaka H. Endothelial Ischemia-Reperfusion Injury in Humans: Association with Age and Habitual Exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011Jan 14.

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher, AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest* 2001; 108 (3): 391-397.

_____, Vasa-Nicotera M. Aging of progenitor cells: limitation for regenerative capacity? *J Am Coll Cardiol* 2003; 42 (12): 2081-2082

Di Pietro L, Dziura J, Blair SN. Estimated change in physical activity level (PAL) and prediction of 5-year weight change in men: the Aerobics Center Longitudinal Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28 (12): 1541–1547

Duncan JJ, Farr JE, Upton SJ, Hagan RD, Oglesby ME, Blair SN. The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in patients with mild essential hypertension. *JAMA* 1985; 254 (18): 2609 –2613.

Durstine JL, Haskell WL. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Exerc Sport Sci Rev* 1994; 22: 477-521.

Fadini GP, Pagano C, Baesso I, Kotsafti O, Doro D, de Kreutzenberg SV, Avogaro A, Agostini C, Dorigo MT. Reduced endothelial progenitor cells and brachial artery flow-mediated dilation as evidence of endothelial dysfunction in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol* 2010; 88 (1): 135-141.

_____, Ilenia Baesso, Albiero M, Satore S, Agostini C, Avogaro A. Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau, *Atherosclerosis* 2008; 197 (2): 496-503.

Fallon KE, Svyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med* 1999; 33 (4): 264-269.

Farrell SW, Cortese GM, LaMonte MJ, Blair SN. Cardiorespiratory fitness, different measures of adiposity, and cancer mortality in men. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15 (12): 3140–3149.

Fisslthaler, B, Dimmeler S, Hermann C, Busse, R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 2000; 168 (1): 81-8.

França SCA, Neto TLB, Agresta MC, Lotufo RFM, Kater CE. Resposta divergente da testosterona e do cortisol séricos em atletas masculinos após uma corrida de maratona. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50 (6): 1082-1086.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 2000; 105 (11): 1631-1639.

Furchgott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 (5789): 373-6.

Galetta F, Franzoni F, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S, Salvetti A, Santoro G. Endothelium-dependent vasodilation and carotid artery wall remodeling in athletes and sedentary subjects. *Atherosclerosis*. 2006; 186 (1): 184-92.

Galla JM, Mahaffey KW, Sapp SK, Alexander JH, Roe MT, Ohman EM, Granger CB, Armstrong PW, Harrington RA, White HD, Simoons ML, Newby LK, Califf RM, Topol EJ. Elevated creatine kinase-MB with normal creatine kinase predicts worse outcomes in patients with acute coronary syndromes: results from 4 large clinical trials. *Am heart J* 2006; 151 (1): 16-24.

Ganz, P., and Vita, J.A. Testing endothelial vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 2003; 108 (17): 2049-2053.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133- positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95 (10): 3106 – 3112.

Gewalting MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 2002; 55 (2): 250-260.

Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in human: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 2003; 108 (5): 530-535.

Goussetis E, Spiropoulos A, Tsironi M, Katerina S, Margeli A, Graphakos S, Baltopoulos P, Papassotiriou I. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: Effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells Mol Dis* 2009; 42 (3): 294-299.

Greendale GA, Barrett-Connor E, Edelstein S, Ingles S, Haile R. Lifetime leisure exercise and osteoporosis. The Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 1995; 141 (10): 951–959.

Green DJ, Cable NT, Fox C, Rankin JM, Taylor RR. Modification of forearm resistance vessels by exercise training in young men. *J Appl Physiol* 1994; 77 (4): 1829-1833.

_____, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 2004; 561 (Pt 1) 1-25.

Griendling KK and FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II. Animal and human studies. *Circulation* 2003; 108 (17): 2034– 2040.

Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000; 355 (9216): 1688 – 1691.

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106 (6): 653–658.

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2003; 107 (25): 3152-3158.

_____, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, and Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 98 (24): 2709-2715.

_____, Wolff A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, and Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342 (7): 454-460.

Haram PM, Kemi OJ, and Wisloff U. Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies. *Front Biosci* 13: 336-346, 2008.

Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension* 2010; 55 (5): 1075-1085.

Haskell WL. The influence of exercise on the concentrations of triglyceride and cholesterol in human plasma. . *Exerc Sport Sci Rev* 1984; 12: 205-244.

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* 2005; 45 (9): 1441–1448.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104 (22): 2673–2678.

Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, Paffenbarger RS. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1991; 325 (3):147–52.

Higashi Y, Sasaki S, Kurisu S, Yoshimizu A, Sasaki N, Matsuura H, Kajiyama G. Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects: role of endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1999; 100 (11): 1194–202.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348(7): 593–600.

Hoetzer GL, Van Guilder GP, Irmiger HM, Keith RS, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J Appl Physiol* 2007; 102(3): 847-852.

Honda A, Matsuura K, Fukushima N, Tsurumi Y, Kasanuki H, Hagiwara N. Telmisartan induces proliferation of human endothelial progenitor cells via PPAR-dependent PI3K/Akt pathway. *Atherosclerosis* 2009; 205 (2): 376–384.

Hornig B, Maier V, Drexler H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1996; 93 (2): 210–214.

Hortobagyi T, Denhan T. Variability in creatine kinase: methodological, exercise and clinically related factors. *Int J Sports Med* 1989; 10 (2): 69–80.

Hristov M, Erl W, and Weber PC. Endothelial progenitor cells: Isolation and characterization. *Trend Cardiovasc Med* 2003; 13 (5): 201-206.

Huang PH, Chen YH, Wang CH, Chen JS, Tsai HY, Lin FY, Lo WY, Wu TC, Sata M, Chen JW, and Lin SJ. Matrix Metalloproteinase-9 Is Essential for Ischemia-Induced Neovascularization by Modulating Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29 (8): 1179-1184.

Ikebuchi K, Ihle JN, Hirai Y, Wong GG, Clark SC, and Ogawa M. Synergistic factors for stem cell proliferation: further studies of the target stem cells and the mechanism of stimulation by interleukin-1, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1988; 72 (6): 2007–2014.

Ingram DA, Caplice NM, and Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 106 (5): 1525-1531.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107 (11): 1395-1402.

Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium dependent coronary arterial vasodilation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993; 88 (6): 2510 –2516.

Kasprzak JD, Kłosińska M, Drozd J. Clinical aspects of assessment of endothelial function. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 33-40.

Khan SS, Solomon MA, Mc Coy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64 (1): 1-8.

Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Van Cott EM, Lee-Lewandrowaki E. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *Am J Clin Pathol* 2002; 118 (6): 856-863.

Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, Karas RH. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38 (7): 1843–49.

Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J Heitz A, Kissner G, Bohm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovascular Prev Rehabil* 2005; 12 (4): 407-414.

_____, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickening G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109 (2): 220-226.

Lee CD, Blair SN, Jackson AS. Cardiorespiratory fitness, body composition, and all-cause and cardiovascular disease mortality in men. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (3): 373–380.

Le Noble, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens* 1998; 16 (11): 1563–1572

Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP, Kingwell BA. Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 (11): 2782-2787.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002 ;105 (9): 1135–1143.

Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, and Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 2006; 20 (9): 1495-1497.

Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006; 98 (5): 697–704.

Linke A, Erbs S, and Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. *Front Biosci* 2008; 13: 424-432.

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105 (1): 71-7.

Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. 1ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butrus L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and

hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7(11): 1194-1201.

Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, Dembo L, Stanton K, Goodman C, Taylor R, Green D. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38 (3): 860-866.

_____, _____, Dembo L, Goodman C, Taylor R, Green D. Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33 (12): 2022-2028.

Manfredini F, Rigolin GM, Malagoni AM, Catizone L, Mandini S, Soffritti O, Mauro E, Soffritti S, Boari B, Cuneo A, Zamboni P, Manfredini R. Exercise training and endothelial progenitor cells in haemodialysis patients. *J Int Med Res* 2009; 37 9(2): 534-540.

Martin JE, Dubbert PM, Cushman WC. Controlled trial of aerobic exercise in hypertension. *Circulation* 1990; 81 (5): 1560 –1567.

Miyachi M, Tanaka H, Yamamoto K, Yoshioka A, Takahashi K, Onodera S. Effects of one-legged *endurance* training on femoral arterial and venous size in healthy humans. *J Appl Physiol* 2001; 90 (6): 2439-2944.

Möbius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, Adams V. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol* 2009; 107 (6): 1943-1950.

Moebius-Winkler S, Schuler G, Adams V. Endothelial progenitor Cells and Exercise-Induced Redox-Regulation. *Antioxid Redox Signal* 2010.

Molina MDCB. **Hipertensão arterial e fatores nutricionais: um estudo com base populacional no município de Vitória – ES.** Tese de doutorado. 2002;

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Morris JN, Clayton DG, Everitt MG, Semmence AM, Burgess EH. Exercise in leisure time: coronary attack and death rates. *Br Heart J* 1990; 63 (6): 325–334.

_____, Crawford MD. Coronary heart disease and physical activity of work; evidence of a national necropsy survey. *Br Med J* 1958; 2: 1485–1496.

_____, Heady JA, Raffle PA, Roberts CG, Parks JW. Coronary heart disease and physical activity of work. *Lancet* 1953; 265 (6796): 1111–1120.

Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, Rahman S, Shah AM, Marber MS, Kearney MT. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(4):936-42.

Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28 (7): 1652-1660.

Nieman DC, Fagoaga OR, Butterworth DE, Warren BJ, Utter A, Davis JM, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL. Carbohydrate supplementation affects blood granulocyte and monocyte trafficking but not function after 2.5 h of running. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (1): 153-159.

Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 2007; 21 (12): 1546-1558.

Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, and Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999 515 (Pt 1): 287–291.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Epstein SE. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323 (1): 22–27.

Paul JD, Powell TM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, Carlow A, Annavajjha V, Shiva S, Dejam A, Gladwin MT, McCoy JP, Zalos G, Press B, Murphy M, Hill JM, Csako G, Waclawiw MA, Cannon RO. Endothelial progenitor cell mobilization and increased intravascular nitric oxide in patients undergoing cardiac rehabilitation. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2007; 27 (2): 65-73.

Peichev, M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95 (3): 952–958.

Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, Vitale C, Speciale G, Gaudio C, Rosano GM, Mercurio G. Angiotensin II receptor antagonism with telmisartan increases number of endothelial progenitor cells in normotensive patients with coronary artery disease: a randomized, Double-blind, placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2010; 210 (2): 510 – 515.

Perry TE, Song M, Despres DJ, Kim SM, San H, Yu ZX, Raghavachari N, Schnermann J, Cannon RO, and Orlic D. Bone marrow-derived cells do not repair endothelium in a mouse model of chronic endothelial cell dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009; 84 (2): 317-325.

Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Ventura G, Zingone A, Perrotti N, Mattioli PL. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelium-dependent vasodilation in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 1998; 31 (4): 900–905.

_____, _____, Pujja A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schiallaci G. Prognostic significance of

endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104 (2): 191-196.

Powell KE, Thompson PD, Caspersen CJ, Kendrick JS. Physical activity and the incidence of coronary heart disease. *Annu Rev Public Health* 1987; 8: 253–287.

Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev* 2003; 31 (1): 26-33.

Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9 (6): 702-712.

Rajappa M, Sharma A. Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 2005; 56 (6): 677-691.

Rattman YD. **Mecanismos Endoteliais Envolvidos nos Efeitos Vasculares Da *dicksonia sellowiana* (presl.) Hook.** Tese de doutorado. 2009; Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Rehman J, Li J, Paryathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, Mahenthiran J, Mach KL. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43 (12): 2314-2318.

Rinder et al., Enhanced endothelium-dependent vasodilation in older endurance-trained men. *J. Appl. Physiol* 2000; 88 (2): 761-766.

Rush JW, Denniss SG, Graham DA. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol* 2005; 30 (4): 442-474.

Saka B, Oflaz H, Erten N, Bahat G, Dursun M, Pamukcub B, Mercanoglu F, Meric M, Karan MA. Non-invasive evaluation of endothelial function in hypertensive elderly patients. *Arch Gerontol and Geriatr* 2005; 40 (1): 61–71.

Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13 (6): 249-253.

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101(16): 1899–1906.

Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111 (22): 2981-2987.

Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol* 2008; 103 (1): 69-77.

Serrano C, Valero A, Picado C. Nasal nitric oxide. *Arch Bronconeumol* 2004; 40 (5): 222-230.

Shantsila E, Lip GY. Endothelial function and endothelial progenitors: possible mediators of the benefits from physical exercise? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16 (4): 401-403.

Shesely EG, Maeda N, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC, Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking

endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(23): 13176-13181.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92 (2): 362 – 367.

Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74 (3): 247–253.

Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, Maier W and Lüscher TF. Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J Human Hypertens* 2000; 14(10-11): 617–630.

Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Woita J, Minar E, Kopp CW. *Endurance* training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary disease. *Atherosclerosis* 2005; 181 (2): 305 – 310.

Sugiura T, Kondo T, Kureishi-Bando Y, Numaguchi Y, Yoshida O, Dohi Y, Kimura G, Ueda R, Rabelink TJ, Murohara T. Nifedipine Improves Endothelial Function: Role of Endothelial Progenitor Cells. *Hypertension* 2008; 52 (3): 491-498.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101 (9): 948–954.

Suzuki K, Yamada M, Kurakeke S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, Kudoh S, Kowatari K, Nakaji S, Sugawara K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after *endurance* exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2000; 81 (4): 281-287.

Tabet JY, Meurin P, Ben Driss A, Weber H, Renaud N, Grosdemouge A, Beauvais F, and Cohen-Solal A. Benefits of exercise training in chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102(10): 721-730.

Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiandoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*. 1995; 91(7): 1981–1987.

_____, _____, _____, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993; 21(6 Pt 2): 929-933.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5 (4): 434–8.

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106 (22): 2781-2786.

Thijssen DH, Vos JB, Verseyden C, Zonneveld AJ, Smits P, Sweep FC, Hopman MT, de Boer HC. Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell* 2006; 5 (6): 495–503.

Tinken TM, Thijssen DH, Hopkins N, Dawson EA, Cable NT, Green DJ. Shear stress mediates endothelial adaptations to exercise training in humans. *Hypertension* 2010; 55 (2): 312-318.

Tran ZV, Weltman A. Differential effects of exercise on serum lipid and lipoprotein levels seen with changes in body weight: a meta-analysis. *JAMA* 1985; 254 (7): 919 –24.

Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-Mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006; 98 (11): 1405–13.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95 (4): 343-353.

_____, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, and Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39 (5): 733-742.

Van Craenenbroeck EMF, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VFI, Hoymans VY, and Conraads VMA. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol* 2008; 104 (4): 1006-1013.

Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103 (24): 2885-2890.

Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am J Cardiol* 2001; 88 (2A): 31E-34E.

Walsh JH, Yong G, Cheetham C, Watts GF, O'Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ. Effects of exercise training on conduit and resistance vessel function in treated and untreated hypercholesterolaemic subjects. *Eur Heart J* 2003; 24 (18): 1681-1689.

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105 (25): 3017–3024.

Walther C, Gaede L, Adams V, gelbrich G, Leichtle A, Erbs S, Sonnabend M, Fikenzer K, Korner A, Kiess W, Bruegel M, Thiery J, Schuler G. Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells: a prospective randomized trial. *Circulation* 2009; 120 (22): 2251-2259.

Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93 (2): e17–e24.

_____, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353 (10): 999-1007.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction. *J Am Coll Cardio* 2003; 42 (7): 1149-1160.

Witkowski S, Lockard MM, Jenkins NT, Obisesan TO, Sangenburger EE, Hagberg JM. Relationship between circulating progenitor cells, vascular function and oxidative stress with long-term training and short-term detraining in older men. *Clin. Science* 2010; 118 (4): 303-311.

Wood PD, Stefanick ML, Williams PT, Haskell WL. The effects on plasma lipoproteins of prudent weight-reducing diet, with or without exercise in overweight men and women. *N Engl J Med* 1991; 325 (7) :461– 6.

Yao EH, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular disease. *Curr Pharm Biotechnol* 2006; 7 (2): 101-108.

Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* 2009; 120 (6): 502-509

Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED, Symons JD. Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signaling kinases. *J Physiol* 2009; 587 (Pt 15): 3911-3920.

Zeiger AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation* 1991; 84 (5): 1984-1992.

_____, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilation function. *Circulation*. 1995; 92 (5):1094 –1100.