

Efeitos de Exercício Crônico Sobre Células Progenitoras Endoteliais e Micropartículas em Corredores Profissionais

Effects of Chronic Exercise on Endothelial Progenitor Cells and Microparticles in Professional Runners

Célia Regina de Oliveira Bittencourt,¹ Maria Cristina de Oliveira Izar,¹ Carolina Nunes França,² Valdir Lauro Schwerz,¹ Rui Manuel dos Santos Póvoa,¹ Francisco Antonio Helfenstein Fonseca¹

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP),¹ Universidade de Santo Amaro,² São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: Os efeitos da exposição crônica ao exercício sobre biomarcadores vasculares foram pouco estudados.

Objetivo: Nosso estudo teve como objetivo comparar as quantidades de células progenitoras endoteliais (CPEs), e de micropartículas endoteliais (MPEs) e plequetárias (MPPs) de corredores profissionais com controles saudáveis.

Métodos: Vinte e cinco corredores de meia maratona e 24 controles pareados quanto à idade e ao sexo foram incluídos no estudo. CPEs (CD34+/KDR+, CD133+/KDR+ e CD34+/CD133+), MPE (CD51+) e MPPs (CD42+/CD31+) foram quantificadas por citometria de fluxo. Todas as amostras de sangue foram obtidas após 12 horas de jejum, e os atletas foram incentivados a realizar seus exercícios de rotina no dia anterior à coleta.

Resultados: Em comparação aos controles, CPEs CD34+/KDR+ ($p=0,038$) e CD133+/KDR+ ($p=0,018$) estavam aumentados, e CPEs CD34+/CD133+ não foram diferentes ($p=0,51$) nos atletas. As concentrações de MP não diferiram entre os grupos.

Conclusão: A exposição crônica ao exercício em corredores profissionais associou-se a uma maior porcentagem de CPEs. Considerando o número similar de MPs entre atletas e controles, o estudo sugere um efeito favorável do exercício sobre esses biomarcadores vasculares. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):212-216)

Palavras-chave: Células Progenitoras Endoteliais; Exercício; Biomarcadores; Atletas; Esportes; Corrida.

Abstract

Background: The effects of chronic exposure to exercise training on vascular biomarkers have been poorly explored.

Objective: Our study aimed to compare the amounts of endothelial progenitor cells (EPCs), and endothelial (EMP) and platelet (PMP) microparticles between professional runners and healthy controls.

Methods: Twenty-five half-marathon runners and 24 age- and gender-matched healthy controls were included in the study. EPCs (CD34+/KDR+, CD133+/KDR+, and CD34+/CD133+), EMP (CD51+) and PMP (CD42+/CD31+) were quantified by flow-cytometry. All blood samples were obtained after 12 h of fasting and the athletes were encouraged to perform their routine exercises on the day before.

Results: As compared with controls, the CD34+/KDR+ EPCs ($p=0.038$) and CD133+/KDR+ EPCs ($p=0.018$) were increased, whereas CD34+/CD133+ EPCs were not different ($p=0.51$) in athletes. In addition, there was no difference in MPs levels between the groups.

Conclusion: Chronic exposure to exercise in professional runners was associated with higher percentage of EPCs. Taking into account the similar number of MPs in athletes and controls, the study suggests a favorable effect of exercise on these vascular biomarkers. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(3):212-216)

Keywords: Endothelial Progenitor Cells; Biomarkers; Athletes; Sports; Running

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Francisco Antonio Helfenstein Fonseca •

Rua Loefgren, 1350. CEP 04040-00, V. Clementino, São Paulo, SP - Brasil

E-mail: ffonseca@cardiol.br; fahfonseca@terra.com.br

Artigo recebido em 11/05/2016; revisado em 23/05/2016; aceito em 10/11/2016.

DOI: 10.5935/abc.20170022

Introdução

Um número adequado de células progenitoras endoteliais (CPEs) circulantes parece estar relacionado com a manutenção da homeostase vascular.^{1,2} De fato, número reduzido de CPEs foi associado com fatores de risco e mortalidade cardiovasculares, e recorrência de eventos cardiovasculares em indivíduos com doença coronariana,^{3,4} apesar de algumas controvérsias em relação à forma de medida, caracterização, origem e destino das células.^{5,6}

Micropartículas (MPs) são pequenas partículas (100-1000nm) anucleadas de fosfolipídio, que podem ser identificadas por sua origem – MPs endoteliais (MPEs), plaquetárias (MPPs), ou de várias outras células. Número aumentado de MPEs foi associado com dano e disfunção endotelial.^{7,8} As MPPs, inicialmente consideradas como marcadores de trombose, são atualmente consideradas importantes para a sinalização transcricional, pela interação com monócitos, e ativação de resposta inflamatória.⁹

A prática de exercícios regulares tem sido amplamente recomendada para a prevenção de doença cardiovascular. Porém, informações sobre os efeitos da exposição crônica e intensa sobre esses biomarcadores vasculares são ainda escassos.^{10,11} Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do exercício crônico sobre CPEs e MPs em corredores profissionais.

Métodos

População do estudo

Vinte e cinco corredores profissionais de meia maratona e 24 controles pareados por sexo e idade, sem diagnóstico de doenças cardiovasculares foram incluídos prospectivamente. Foram excluídos indivíduos com fatores de risco cardiovasculares tais como hipertensão, diabetes, obesidade, tabagismo, ou hipercolesterolemia. O comitê de ética local aprovou o estudo (#1808/08) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento antes de serem incluídos no protocolo do estudo.

Análises laboratoriais

As amostras de sangue foram obtidas após 12 horas de jejum, e as análises foram realizadas no laboratório central de nossa universidade. Todos os atletas mantiveram seus programas de exercício diário até mesmo no dia anterior ao da coleta de amostra de sangue. Os programas de treinamento dos atletas eram muito semelhantes entre si, correspondendo a duas sessões de corrida de longa distância diariamente, 15 km de manhã e 10 km à tarde, e treinamentos intensivos (tiros de 100 a 1000 m de distância, repetidos várias vezes) duas vezes por semana, nas terças e quintas de manhã. Todas as amostras de sangue foram colhidas nas quintas-feiras, antes do exercício.

As medidas de CPEs e MPs foram realizadas conforme descrito anteriormente, utilizando amostras de sangue fresco colhido em tubos contendo EDTA.¹²⁻¹⁵ Para a determinação de CPEs, foram adquiridos um mínimo de 500 000 eventos por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Foram usados anticorpos de camundongos anti-humanos marcados por fluorescência

para CPEs (CD34 FITC, BD Biosciences, USA; CD133 APC, Miltenyi Biotec, USA; KDR PE, R&D Systems, USA), MPPs (CD42 FITC e CD31 PE, BD Biosciences, USA), e MPEs (CD51 FITC, BD Biosciences). Foram usados recipientes descartáveis para quantificar o número de micropartículas por microlitro de plasma pobre em plaquetas (PPP).

Análise estatística

Os resultados são apresentados em média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil para distribuições normais e não normais respectivamente. As variáveis categóricas foram comparadas por teste de qui-quadrado de Pearson. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram usados para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. Comparações entre grupos das variáveis contínuas foram feitas pelo teste t não pareado ou pelo teste de Mann-Whitney quando apropriado. O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar correlações de CPEs e MPs com variáveis de ergoespirometria. Todas as análises foram realizadas pelo programa SPSS para Windows, versão 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL), e um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Resultados

Todos os atletas relataram haver feito exercício no dia anterior à coleta de sangue ($22,08 \pm 2,67$ km, média \pm DP), e a média de tempo entre a última sessão de exercício e a coleta de sangue foi de $16,5 \pm 2,8$ horas. Não houve diferença entre homens e mulheres quanto à distância percorrida (124 ± 25 vs. 128 ± 29 km por semana, $p = 0,88$, respectivamente, média \pm DP, teste t não pareado) ou tempo de treinamento (14 ± 4 vs. 14 ± 7 horas por semana, média \pm DP, $p = 0,53$, respectivamente, teste t não pareado). Apesar de haverem recebido o mesmo treinamento, atletas do sexo masculino relataram um melhor tempo médio para a distância de 10 000 metros em comparação a atletas do sexo feminino ($32,4 \pm 2,1$ vs. $37,6 \pm 1,6$ min, $p < 0,0001$, média \pm DP, teste t não pareado). Em comparação aos controles, os atletas apresentaram menor peso, índice de massa corporal, circunferência abdominal, e porcentagem de gordura corporal, menor frequência cardíaca, maior porcentagem de gordura corporal e valores similares de pressão sistólica e diastólica. Apresentaram ainda menores níveis de colesterol total, LDL-c e triglicérides, e valores mais elevados de HDL-c.

Células progenitoras endoteliais e micropartículas

Em comparação aos controles, os atletas apresentaram maior porcentagem de duas linhagens de CPEs (CD34+/KDR+ e CD133+/KDR+) e porcentagem similar de células CD34+/CD133+ (Figura 1).

A quantidade de MPP não foi diferente entre os grupos (Figura 2).

Não houve correlação entre a porcentagem de CPEs ou MPs com variáveis de ergoespirometria, incluindo taxa absoluta e máxima de consumo de oxigênio ($\text{VO}_2 \text{ max}$) (dados não apresentados).

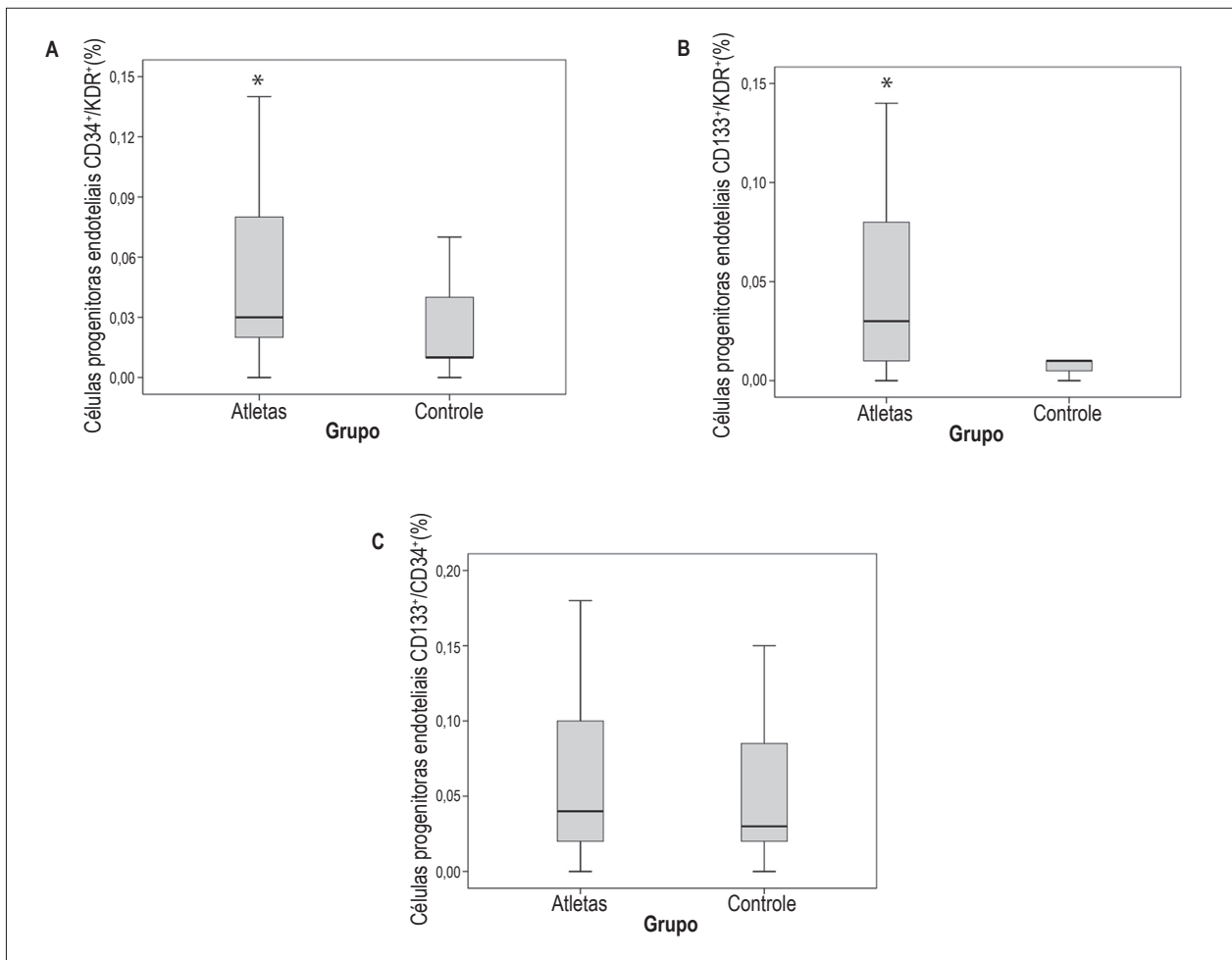


Figura 1 – Box-plots mostrando a porcentagem de células progenitoras endoteliais (CPEs) determinadas por citometria de fluxo. Porcentagens mais altas de CD34⁺/KDR⁺ EPCs (A) ($p=0,038$ vs. controles, teste de Mann-Whitney) e de CD133⁺/KDR⁺ EPCs (B) ($p=0,018$ vs. controles, teste de Mann-Whitney) foram encontradas em atletas. Não foi observada diferença entre os grupos para CD133⁺/CD34⁺ ($p=0,51$) (C).

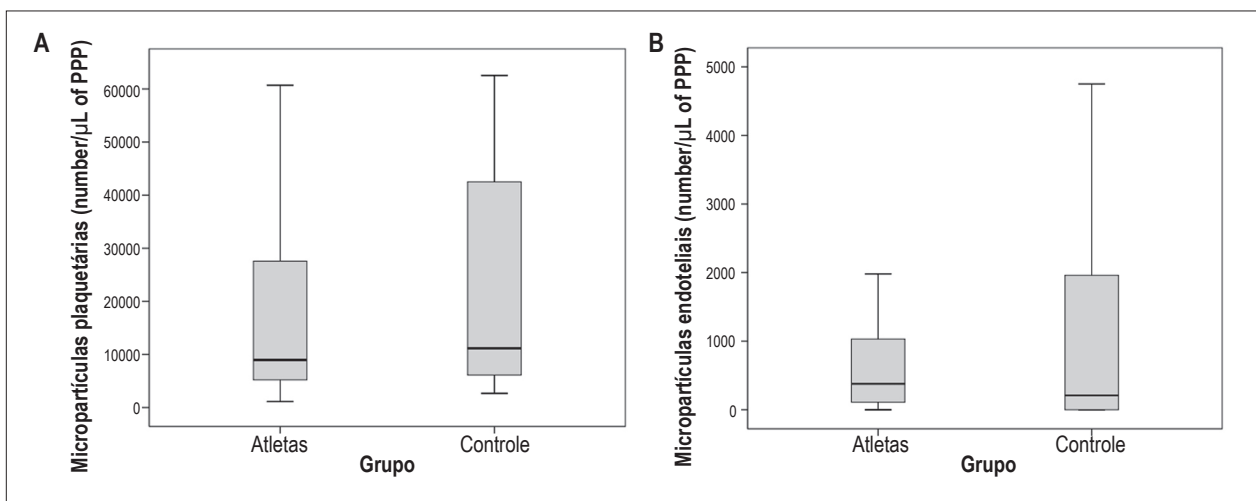


Figura 2 – Box-plots representando a quantidade de micropartículas circulantes determinada por citometria de fluxo. O número de micropartículas plaquetárias (MPPs) de CD42⁺/CD31⁺ (A) e micropartículas endoteliais (MPEs) de CD51⁺ (B) foi similar entre os grupos (MPPs, $p=0,695$, teste de Mann-Whitney; MPEs, $p=0,496$, teste de Mann-Whitney). PPP: plasma pobre em plaquetas.

Discussão

O presente estudo revelou que a exposição crônica ao treinamento em corredores profissionais esteve associada com porcentagens aumentadas de CPEs circulantes sem alterações na quantidade de MPEs ou MPPs. Esses achados sugerem que o exercício crônico não se associou com apoptose de células endoteliais ou trombose nesses indivíduos. De fato, parece haver exercido um papel protetor, considerando-se o aumento nas CPEs. Em nossos atletas, as amostras de sangue foram coletadas durante seus programas de treinamento de rotina, uma vez que nosso objetivo foi avaliar CPEs e MPs no contexto da vida real desses indivíduos.

Vários fatores de risco cardiovasculares, incluindo diabetes,³ hipertensão,¹⁶ tabagismo,¹⁷ hipercolesterolemia,¹⁸ e idade¹⁹ foram relacionados à disfunção de CPEs. Por outro lado, o exercício foi reconhecido como uma ferramenta promissora para aumentar os níveis de MPEs.^{20,21} Estudos experimentais e clínicos iniciais^{22,23} relataram CPEs aumentadas após a prática regular de exercício, apesar de os efeitos dos exercícios sobre CPEs parecerem ser influenciados pelo regime de treinamento, idade dos indivíduos, e presença de doença cardiovascular, tais como doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca.²⁰

MPEs circulantes foram associadas a vários estímulos, incluindo a transcrição de interleucinas, quimiocinas e quimioatraentes, e ao estresse oxidativo.^{8,24} Todas essas condições estão associadas a fatores de risco cardiovascular clássicos mas, mais recentemente, novos efeitos biológicos mediados pelas MPEs foram considerados, incluindo transporte de RNAm, micro-RNAs e outras moléculas ativas, de importância fisiológica para a angiogênese e reparo tecidual.²⁵

A ativação celular e a apoptose estão associadas à liberação de MPs. Particularmente, a quantidade de MPPs foi considerada como um possível marcador de trombose, dada à quantidade de fosfolipídios dessas partículas e potencial papel pró-trombogênico pela produção de trombina.²⁶ Além disso, uma tensão de cisalhamento elevada leva à agregação plaquetária e liberação de MPs derivadas de plaquetas.²⁷ Além disso, MPPs podem carregar fator tissular, o qual também pode produzir trombina e ativação plaquetária. No entanto, também é verdade que as MPs podem transportar alguns inibidores da coagulação, tais como inibidor da via do fator tecidual (TFPI) que pode neutralizar, em parte, as propriedades pró-coagulantes dessas MPs.²⁸ Mais recentemente, foram propostos aspectos interessantes que ligam MPPs à sinalização de resposta imune e inflamatória, considerando fatores transcricionais potenciais nas plaquetas, que incluem o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ).²⁹

Em nosso estudo, encontramos porcentagens aumentadas de CPEs nos atletas, e quantidades semelhantes de MPEs e MPPs em comparação a indivíduos controles, apesar do treinamento intensivo desses indivíduos. Esses resultados promissores são importantes, uma vez que nosso entendimento sobre o papel do exercício sobre CPEs e MPs deriva-se principalmente da exposição aguda ao exercício ou em indivíduos não

atletas.^{10,11,30,31} O exercício intermitente e de alta intensidade induz a liberação de catecolaminas e reduz células T altamente diferenciadas, mas não aumenta a quantidade de CPEs quando comparado ao exercício contínuo.³³ Em outro artigo, apesar do aumento na contagem global de leucócitos, não houve alteração no número de CPEs em corredores maratonistas de idade avançada, quando coletados no período precoce após a corrida.³³

Além disso, entre outras variáveis bioquímicas, os níveis de proteína C reativa foram mais baixos nos atletas que nos controles, e os níveis de creatinofosfoquinase um pouco aumentados, apesar do treino de rotina no dia anterior à coleta de amostra, o que reforça as propriedades protetoras do exercício de alto desempenho.

Limitações do estudo

Apesar de ser um estudo transversal, de caso controle, nossos resultados não podem ser considerados como geradores de hipótese, uma vez que não temos dados laboratoriais basais dos atletas. Além disso, esses resultados são aplicáveis aos maratonistas, e não podem ser extrapolados a outros esportes.

Conclusões

O exercício crônico foi associado com um aumento favorável nos níveis de CPEs, sem afetar os níveis de MPs circulantes em corredores profissionais, sugerindo um impacto positivo da exposição prolongada ao exercício crônico nesses biomarcadores vasculares.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Izar MCO, Fonseca FAH; Obtenção de dados: Bittencourt CRO, França CN, Scherz VL; Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Bittencourt CRO, Izar MCO, França CN, Scherz VL, Póvoa RMS, Fonseca FAH; Análise estatística: Bittencourt CRO, Izar MCO, França CN, Fonseca FAH; Obtenção de financiamento: Fonseca FAH; Redação do manuscrito: Izar MCO, França CN, Póvoa RMS, Fonseca FAH.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP e parcialmente financiado pela CAPES.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Célia Regina de Oliveira Bittencourt pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Referências

1. Chan KH, Simpson PJ, Yong AS, Dunn LL, Chawantanpipat C, Hsu C, et al. The relationship between endothelial progenitor cell populations and epicardial and microvascular coronary disease—a cellular, angiographic and physiologic study. *PLoS One*. 2014;9(4):e93980.
2. Madonna R, De Caterina R. Circulating endothelial progenitor cells: Do they live up to their name? *Vascul Pharmacol*. 2015 Apr-Jun;67-69:2-5.
3. Saad MI, Abdelkhalik TM, Saleh MM, Kamel MA, Youssef M, Tawfik SH, et al. Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. *Endocrine*. 2015;50(3):537-67.
4. Peng J, Liu B, Ma QL, Luo XJ. Dysfunctional endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: role of NADPH oxidase. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65(1):80-7.
5. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353(10):999-1007.
6. Bakogiannis C, Tousoulis D, Androulakis E, Briasoulis A, Papageorgiou N, Vogiatzi G, et al. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes. *Curr Med Chem*. 2012;19:2597-604.
7. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res*. 2010;107(9):1047-57.
8. Berezin A, Zulli A, Kerrigan S, Petrovic D, Kruzliak P. Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clin Biochem*. 2015;48(9):562-8.
9. Nomura S, Shimizu M. Clinical Significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care*. 2015;3(1):2.
10. Guiraud T, Gayda M, Juneau M, Bosquet L, Meyer P, Théberge-Julien G, et al. A single bout of high-intensity interval exercise does not increase endothelial or platelet microparticles in stable, physically fit men with coronary heart disease. *Can J Cardiol*. 2013;29(10):1285-91.
11. Wahl P, Jansen F, Achtzehn S, Schmitz T, Bloch W, Mester J, et al. Effects of high intensity training and high volume training on endothelial microparticles and angiogenic growth factors. *PLoS One*. 2014;9(4):e96024.
12. Camargo LM, França CN, Izar MC, Bianco HT, Lins LS, Barbosa SP, et al. Effects of simvastatin/ezetimibe on microparticles, endothelial progenitor cells and platelet aggregation in subjects with coronary heart disease under platelet therapy. *Braz J Med Biol Res*. 2014;47(5):432-7.
13. Lins LC, França CN, Fonseca FA, Barbosa SP, Matos LN, Aguirre AC, et al. Effects of ezetimibe on endothelial progenitor cells and microparticles in high-risk patients. *Cell Biochem Biophys*. 2014;70(1):687-96.
14. Pinheiro LF, França CN, Izar MC, Barbosa SP, Bianco HT, Kasma SH, et al. Pharmacokinetic interactions between clopidogrel and rosuvastatin: effects on vascular protection in subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol*. 2012;158(1):1125-9.
15. da Silva EF, Fonseca FA, França CN, Ferreira PR, Izar MC, Salomão R, et al. Imbalance between endothelial progenitor cells and microparticles in HIV-infected patients naive for antiretroviral therapy. *AIDS*. 2011;25(13):1595-601.
16. Pirro M, Schillaci G, Menicali C, Bagaglia F, Paltriccina R, Vaudo G, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *J Hypertens*. 2007;25(10):2093-9.
17. Lamirault G, Susen S, Forest V, Hemont C, Parini A, Le Corvoisier P, et al. Difference in mobilization of progenitor cells after myocardial infarction in smoking versus non-smoking patients: insights from the BONAMI trial. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(6):152.
18. Rodríguez C, Slevin M, Rodríguez-Calvo R, Kumar S, Krupinski J, Tejerina T, et al. Modulation of endothelium and endothelial progenitor cell function by low-density lipoproteins: implication for vascular repair, angiogenesis and vasculogenesis. *Pathobiology*. 2009;76(1):11-22.
19. Goligorsky MS. Endothelial progenitor cells: from senescence to rejuvenation. *Semin Nephrol*. 2014;34(4):365-73.
20. Koutroumpi M, Dimopoulos S, Psarra K, Kyprianou T, Nanas S. Circulating endothelial and progenitor cells: Evidence from acute and long-term exercise effects. *World J Cardiol*. 2012;4(12):312-26.
21. De Biase C, De Rosa R, Luciano R, De Luca S, Capuano E, Trimarco B, et al. Effects of physical activity on endothelial progenitor cells (EPCs). *Front Physiol*. 2014; Feb 3;4:414.
22. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109(2):220-6.
23. 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*. 1985; (1985). 2007;102(3):847-52.
24. Lee SK, Yang SH, Kwon I, Lee OH, Heo JH. Role of tumour necrosis factor receptor-1 and nuclear factor- κ B in production of TNF- α -induced pro-inflammatory microparticles in endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2014;112(3):580-8.
25. Enjeti AK, Lincz LF, Seldon M. Microparticles in health and disease. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(7):683-91.
26. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85(4):639-46.
27. Nomura S. Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. *Int J Hematol*. 2001;74(4):397-404.
28. Keuren FJ, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, Lindhout T, Curvers J. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol*. 2006;134(3):307-13.
29. Lannan KL, Sahler J, Kim N, Spinelli SL, Maggirwar SB, Garraud O, et al. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol*. 2015;Feb 6:48.
30. Fernandes JM, Rosado-Alvares D, Da Silva Grigoletto ME, Rangel-Zuniga OA, Landaeta-Diaz LL, et al. Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 123(6):361-73.
31. Rakobowchuk M, Harris E, Taylor A, Baliga V, Cubbon RM, Rossiter HB, et al. Heavy and moderate interval exercise training alters low-flow-mediated constriction but does not increase circulation progenitor cells in healthy humans. *Exp Physiol*. 2013;97(3):375-85.
32. Kruger K, Alack K, Ringseis R, Mink L, Pfeifer E, Schinle M, et al. Apoptosis of T-Cell subsets after acute high-intensity interval exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2016;48(10):2021-9.
33. Adams V, Linke A, Breuckmann F, Leineweber K, Erbs S, Kränkel N, et al. Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008;15(5):602-7.