

## Movilización de Células Progenitoras Endoteliales con el Ejercicio en Sanos: una Revisión Sistemática

Jemima Fuentes Ribeiro da Silva<sup>1</sup>, Natália Galito Rocha<sup>1</sup>, Antonio Claudio Lucas da Nóbrega<sup>1,2</sup>

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares - Universidade Federal Fluminense<sup>1</sup>; Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal Fluminense<sup>2</sup>, Niterói, RJ, Brasil

El ejercicio físico moviliza Células Progenitoras Endoteliales (CPE) hacia la sangre periférica. Entre tanto, ese efecto parece depender de características del ejercicio, como duración e intensidad.

El objetivo de este estudio fue verificar, por medio de revisión sistemática, el impacto de una única sesión de ejercicio aeróbico sobre la Movilización de CPE en individuos sanos y los potenciales mecanismos envueltos.

La búsqueda bibliográfica fue realizada en las bases de datos electrónicas SciELO, LILACS, Cochrane, ClinicalTrials.gov, SPORTDiscus y Medline, en mayo de 2011. De los 178 estudios inicialmente identificados, 12 respondieron a los criterios de inclusión y fueron clasificados en cuanto a la calidad mediante criterios de la escala PEDro.

La magnitud y la duración de la respuesta de Movilización de las CPE fueron mayores después de la realización de ejercicios de larga/ultra larga duración y están correlacionadas con niveles plasmáticos de factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF). El pico de Movilización de esas células en respuesta a una sesión de ejercicio máximo o submáximo, con duración de hasta una hora, ocurre en el período inmediatamente después del esfuerzo y hasta una hora después de su interrupción. Un posible mecanismo es la biodisponibilidad del Óxido Nítrico (NO). La edad de los individuos y la intensidad del ejercicio parecen interferir en la respuesta de Movilización de las CPE.

Ejercicios de larga/ultra larga duración promueven Movilización más acentuada de las CPE cuando son comparados a ejercicios máximos o submáximos. Los mecanismos envuelven la liberación del VEGF en ejercicios de larga/ultra larga duración y la biodisponibilidad de NO en ejercicios máximo y submáximo con hasta una hora de duración.

### Palabras clave

Ejercicio, células progenitoras endoteliales, movilización de células.

### Introducción

Las Células Progenitoras Endoteliales (CPE), descritas en 1997 por Asahara et al<sup>1</sup>, constituyen una población heterogénea de células circulantes en la sangre periférica<sup>1</sup> cuyo origen se encuentra en múltiples precursores, incluyendo hemangioblastos<sup>1</sup>, precursores no hematopoyéticos, células monocíticas<sup>2</sup> o células tronco residentes en los tejidos<sup>3</sup>. Esas células desempeñan una importante función en la reparación vascular y en la formación de nuevos vasos en razón de su capacidad de proliferar, migrar, diferenciarse *in vivo* e *in vitro* en células endoteliales<sup>1</sup>, así como incorporarse al endotelio preexistente<sup>2,4</sup>. Por eso, presentan, fenotípicamente, tanto características morfofuncionales de células hematopoyéticas como de células endoteliales maduras<sup>5</sup>.

Las CPE son raras, representando cerca de 0,01% a 0,0001% de la fracción mononuclear en la sangre periférica<sup>6</sup>. Entre tanto, diversos estímulos son capaces de movilizarlas de la médula ósea, elevándolas temporalmente en la circulación periférica, y entre esos estímulos se destaca el ejercicio físico<sup>7-9</sup>. Una vez en la circulación periférica, las CPE secretan factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)<sup>10</sup> y el factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF)<sup>11</sup>, capaces de estimular paracrinamente los procesos de neovascularización y angiogénesis<sup>1</sup>.

La práctica regular de ejercicios físicos contribuye a la reducción de cerca de 30% de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares<sup>12</sup>. Como la disminución de factores de riesgo cardiometabólicos clásicos como hiperlipidemia, hipertensión y resistencia a la insulina explica apenas aproximadamente 40% de la reducción de la mortalidad inducida por ejercicios<sup>13</sup>, variables relacionadas directamente al endotelio podrían ayudar a explicar por qué y como los ejercicios físicos previenen, disminuyen la progresión y reducen la mortalidad resultante de la presencia de enfermedades cardiovasculares<sup>14</sup>.

Uno de los posibles mecanismos envueltos en ese proceso es la movilización de CPE a la sangre periférica<sup>9</sup>. Con todo, diferentes tipos, duraciones e intensidades de ejercicio pueden promover distintas respuestas y, consecuentemente, alterar la biodisponibilidad y funcionalidad de las CPE. Así, revisamos de forma sistemática el impacto de una sesión de ejercicio aeróbico en la Movilización de CPE en individuos sanos y los posibles mecanismos envueltos en ese proceso.

**Correspondencia:** Antonio Claudio Lucas da Nóbrega •  
Laboratório de Ciências do Exercício - Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense - Rua Professor Hernani Pires de Melo, 101 - Sala 106 - 24210-130, Niterói, RJ, Brazil  
E-mail: anobrega@id.uff.br  
Artículo recibido el 03/06/11; revisado recibido el 13/07/11; aceptado el 18/07/11.

## Métodos

### Selección de los estudios

La búsqueda bibliográfica fue realizada en el mes de mayo de 2011, por dos evaluadores independientes (JFRS y NGR) por medio de las bases de datos electrónicas SciELO, Cochrane, LILACS, ClinicalTrials.gov, SPORTDiscus y Medline. Los trabajos fueron consultados utilizando todos o parte de los descriptores identificados a seguir en inglés y su correspondencia en portugués: (“endothelial progenitor” OR CD34+KDR+ OR CD34+VEGFR2+ OR sca-1 flk-1 OR CD133+VEGFR2+ OR CD133+KDR+ OR AC133+VEGFR2+ OR AC133+KDR+ OR “circulating angiogenic cells” OR “blood derived progenitor cells” OR “circulating progenitor”) AND (exercise OR “aerobic fitness” OR training OR “physical activity” OR “physical fitness” OR “sports activities” OR “sports medicine” OR marathon OR athletes OR cyclists OR runners OR ergometer OR endurance OR treadmill).

Fueron identificados 178 estudios en todas las bases de datos electrónicas. Después de aplicación de los términos NOT disease y NOT review a la búsqueda, fueron seleccionados 56 estudios en la base Medline, cuatro en la base ClinicalTrials.gov, dos en la base SciELO, dos en la

base Cochrane, uno en la base SPORTDiscus y ninguno en la base LILACS. De esos, dos estudios fueron encontrados en dos bases de datos distintas (Medline y Cochrane), y un estudio fue encontrado en tres bases de datos distintas (Medline, ClinicalTrials.gov y SPORTDiscus).

Mediante un análisis manual, fueron excluidos estudios cuyos participantes fuesen niños o adolescentes (n = 02); afectados por enfermedad, inflamación, alteración metabólica o hiciesen uso de drogas (n = 27); estudios que no evaluaran la intervención o el desenlace de interés, o sea, la intervención no fuese una sesión única de ejercicio físico o la población celular analizada no correspondiese al perfil de CPE, según criterios de inclusión (n = 19); y estudio de revisión (n = 01) (Figura 1).

Cuando el título y el abstract (resumen) de la publicación sugerían que el estudio fuese potencialmente elegible para la inclusión, una copia del texto completo era obtenida y el estudio era clasificado mediante la aplicación de cinco criterios de inclusión: 1. Año de publicación: a partir de 1997, fecha de la primera publicación sobre CPE; 2. Delineamiento de los estudios: cohorte, transversales, ensayos clínicos, ensayos clínicos controlados y ensayos clínicos controlados randomizados; 3. Población del estudio: adultos sanos (humanos o animales); 4. Intervención:

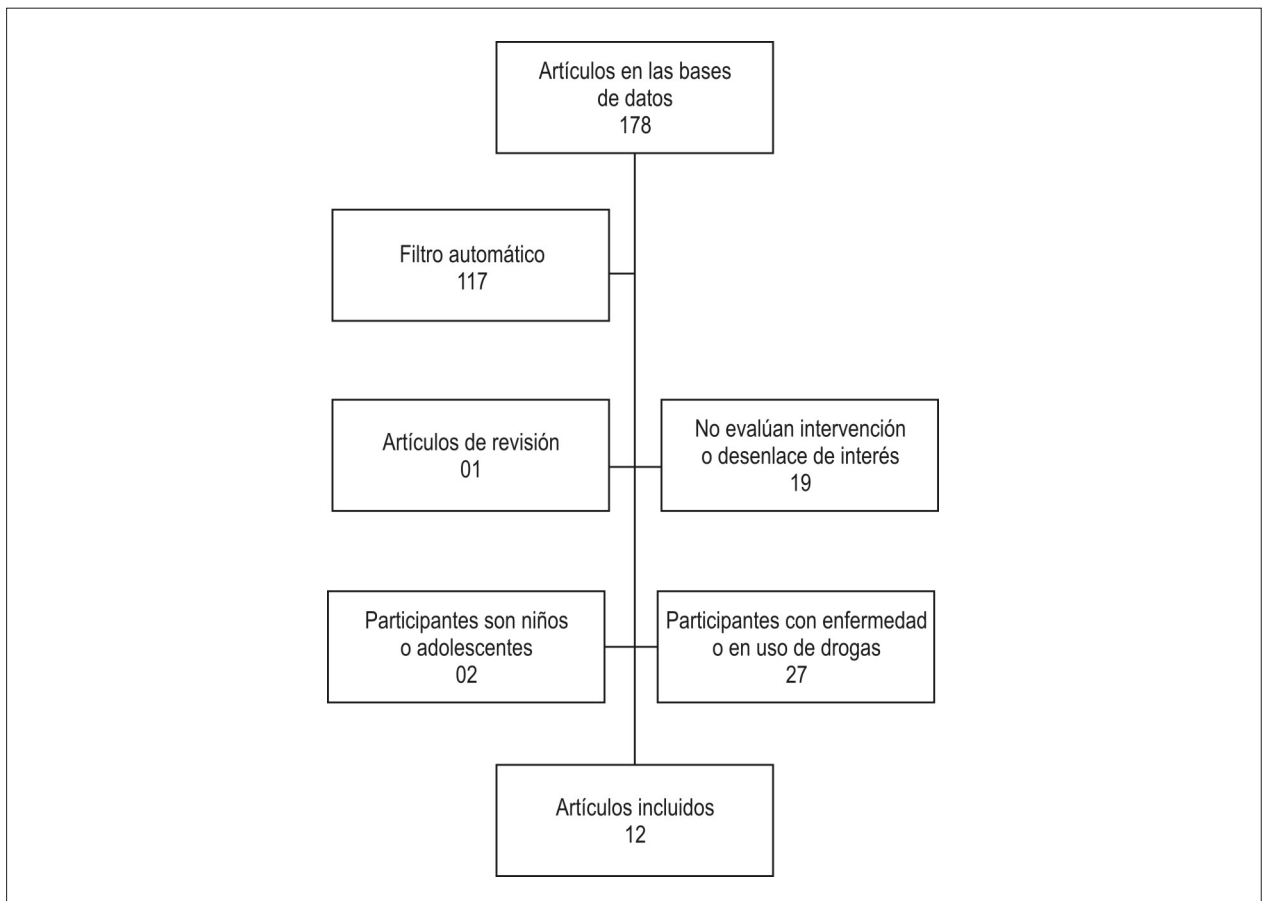


Figura 1 - Diagrama de flujo de la selección de los estudios.

una sesión de ejercicio físico aeróbico; y 5. Desenlace de interés: evaluación cuantitativa de las CPE, caracterizadas como positivas para CD133 (AC133) o CD34 (sca-1) y VEGFR2 (KDR o flk-1), o unidades formadoras de colonia de célula endotelial (UFC-CE)<sup>15</sup>.

La calidad de los estudios fue evaluada por medio de la escala PEDro<sup>16</sup>, en la cual estudios con un score mayor o igual a cuatro son clasificados como de alta calidad. Los criterios adoptados fueron: 1. Criterios de inclusión bien definidos; 2. Ubicación aleatoria entre los grupos; 3. Descripción de las características demográficas y el tamaño de la muestra ( $\geq$

8 individuos); 4. Ciego (los participantes o los evaluadores o los análisis de resultados fueron hechos de forma ciega); 5. Método suficiente (cuando el protocolo de ejercicio fue descrito detalladamente o el análisis celular fue realizado por al menos un método cuantitativo o cualitativo); 6. Mediciones (fueron obtenidas en más de 85% de los individuos inicialmente ubicados en los grupos para al menos un resultado clave); 7. Análisis estadístico (fue descrito, al menos, un resultado de las comparaciones estadísticas entre grupos o entre momentos); 8. Análisis de regresión (para evaluar la asociación entre las variables intervención y desenlace) (Tabla 1).

Tabla 1 – Calidad metodológica de los estudios

Estudio	Criterios inclusión	Ubicación aleatoria	Muestra	Ciego	Métodos	Medidas	Análisis estadístico	Análisis de regresión	Resultado
Adams et al., 2008 <sup>7</sup>	+	-	68 ♂ entrenados, 57±6 años	+	+	+	+	-	6/8
Bonsignore et al., 2010 <sup>9</sup>	+	-	Maratón (n=9,44±12 años); Carrera de 1.500 m (n=8,43 ±11 años)	+	+	+	+	+	7/8
Cubbon et al., 2010 <sup>26</sup>	+	-	15 europeos sedentarios, 28±1 año; 15 sudasiáticos sedentarios, 30±1 año	+	+	+	+	+	7/8
Goussetis et al., 2009 <sup>19</sup>	+	-	10 ♂ entrenados, 43±1 año; 10 ♂ sedentarios, 42±10 años	-	+	+	+	-	5/8
Jenkins et al., 2009 <sup>17</sup>	+	-	8 ♂ entrenados, 25±4 años; 8 ♂ activos, 25±3 años	+	+	+	+	-	6/8
Laufs et al., 2005 <sup>27</sup>	+	+	25 ♂ entrenados, 28±7 años	+	+	+	+	-	7/8
Lockard et al., 2010 <sup>18</sup>	+	-	12 ♂ entrenados, 62±2 años; 11 ♂ activos, 65±2 años	-	+	+	+	-	5/8
Möbius-Winkler et al., 2009 <sup>22</sup>	+	-	18 ♂ entrenados, 32±2 años	-	+	+	+	+	6/8
Thijssen et al., 2006 <sup>21</sup>	+	-	8 añosos sedentarios (67-76 años); 8 jóvenes sedentarios (19-28 años); 8 jóvenes entrenados (18-28 años)	-	+	+	+	+	6/8
Thorell et al., 2009 <sup>25</sup>	+	-	11 individuo entrenados (9 ♀ y 2 ♂), 31±7 años	-	+	+	+	-	5/8
Van Craenenbroeck et al., 2008 <sup>23</sup>	+	-	11 individuos activos, 24±1 año; 14 individuo activos, 36±9 años	-	+	+	+	-	5/8
Yang et al., 2007 <sup>24</sup>	+	-	16 ♂ sedentarios, 25±3 años	+	+	+	+	+	7/8

(+) – aplicado por el estudio; (-) – no aplicado por el estudio.

### Extracción de los datos

Fueron extraídos los siguientes datos de cada publicación: el nombre del primer autor y el año de publicación; los datos de la población/demografía/tamaño de la muestra; el momento de obtención de la muestra de sangre; las variables estudiadas y el método por el cual fueron analizadas; el protocolo, la intensidad y el volumen del ejercicio; y los resultados del estudio, con la correlación entre intervención y desenlace.

### Características de los participantes

El nivel de entrenamiento de los participantes varió desde individuos denominados como no activos o sedentarios<sup>17,18</sup> hasta atletas que terminaron una carrera de 246 Km. en hasta 36 horas<sup>19</sup>. Por esa razón, en la presente revisión sistemática fue elaborada una clasificación basada en el volumen de entrenamiento de los participantes de todos los estudios a fin de estandarizar y calificar los individuos en solamente tres niveles de condición física: Grupo sedentario, participantes cuyo volumen de entrenamiento aeróbico era inferior o igual a una vez por semana, con sesiones de 20 minutos; Grupo activo, practicantes de ejercicio aeróbico dos a tres veces por semana, con sesiones de 20 minutos; Grupo entrenado, participantes cuyo volumen de entrenamiento aeróbico era superior o igual a cuatro veces por semana, con sesiones de 30 minutos.

### Características del ejercicio

La respuesta de las CPE al ejercicio puede variar de acuerdo con el tipo de protocolo utilizado<sup>7,8,20</sup>. Por eso, fueron extraídos de cada estudio los datos referentes a intensidad, volumen, duración y frecuencia de ejercicio físico utilizado, informaciones sobre valores porcentuales de la frecuencia cardíaca máxima, del consumo de oxígeno ( $\text{VO}_2$ ) máximo o del umbral anaeróbico de los participantes, así como la descripción de los autores sobre el protocolo de ejercicio utilizado, posibilitando la clasificación de los ejercicios en tres categorías: 1. Ejercicio de larga/ultra larga duración (medio maratón, maratón o ultra maratón); 2. Ejercicio de intensidad máxima, normalmente de carácter progresivo alcanzando el máximo del esfuerzo y/o  $\text{VO}_2$  máximo en alrededor de 5 a 20 minutos. Son ejemplos típicos el test ergométrico convencional o el test cardiopulmonar de ejercicio (TCPE); y 3. Ejercicio de intensidad submáxima, normalmente utilizando como referencia el porcentual del umbral anaeróbico y/o  $\text{VO}_2$  máximo y con duración máxima de una hora. En el presente estudio, la intensidad del ejercicio varió entre 80% y 100% del umbral anaeróbico o superior a 75% del  $\text{VO}_2$  máximo.

### Resultados

Los 12 estudios incluidos fueron clasificados como de alta calidad. De esos, siete eran del tipo transversal; cuatro, del tipo longitudinal; y uno, con ambos delineamientos. En todos los estudios incluidos, los procedimientos metodológicos adoptados en el dimensionamiento y en la selección de la muestra, las mediciones de las variables y los aspectos éticos fueron suficientemente descriptos. La composición de las muestras (en total 286 participantes) varió en cuanto a la franja etárea, de 18 a 80 años, y a la condición física, de sedentarios a entrenados (tabla 1).

La mayoría de los estudios relató efectos significativos del ejercicio de diferentes características sobre la Movilización de CPE a la sangre periférica. Mientras tanto, el volumen de entrenamiento o condición física del participante no influyó el número de CPE en el momento preejercicio<sup>17,18,21</sup>. Además de eso, después de una sesión única de ejercicio submáximo, el número de CPE aumentó en la circulación de participantes con mayor volumen de entrenamiento<sup>17</sup>, sugiriendo la necesidad de un estímulo agudo perturbador en el organismo para la Movilización de las células progenitoras endoteliales.

En las tablas 2a-2c son presentadas informaciones específicas sobre los estudios incluidos y ordenados como: 1. Ejercicio de larga/ultra larga duración (n = 4 estudios, tab. 2a); 2. Ejercicio de intensidad máxima (n = 4 estudios, tab. 2b); 3. Ejercicio de intensidad submáxima (n = 5 estudios, tab. 2c).

### Ejercicio de larga/ultra larga duración

El aumento en el número de células CD34+/KDR+ o de UFC-CE después de un ejercicio de larga/ultra larga duración (maratón/carrera de ultra distancia) fue observado en tres de los cuatro estudios evaluados (tab. 2a). En los estudios analizados, ocurrió elevación de los marcadores inflamatorios después del ejercicio, destacándose la interleucina-6<sup>8,19,22</sup>.

En individuo entrenados, el número de células CD34+/KDR+ aumentó, aproximadamente, dos veces al final de un maratón ( $p < 0,005$ ), mientras el número de Células Angiogénicas Circulantes (CAC) aumentó, aproximadamente, tres veces ( $8,5 \pm 1,9$  vs.  $30,2 \pm 4,6$  células/ $1 \times 10^6$  mononucleares;  $p < 0,0001$ ), con retorno a los niveles basales en la mañana del día siguiente<sup>8</sup> ( $10,9 \pm 1,8$  células/ $1 \times 10^6$  mononucleares). También en hombres entrenados, el número de UFC-CE aumentó en alrededor de 11 veces ( $44,5 \pm 2,5$  vs.  $494,5 \pm 27,9/\text{mL}$ ) después del término de una carrera de ultra distancia (246 km) en hasta 36 horas, manteniendo los niveles elevados hasta 48 horas ( $428,5 \pm 31,5/\text{mL}$ ;  $p < 0,0001$ ) después del término de la carrera<sup>19</sup>. A su vez, aun en corredores entrenados, el número de células CD34+/VEGFR2+ no se alteró después de un maratón<sup>7</sup> ( $117,0 \pm 8,0$  vs.  $128,0 \pm 9,0$  células/ $\text{mL}$ ;  $p = 0,33$ ). Una sesión de ejercicio en cicloergómetro a 70% del umbral anaeróbico reveló aumento de 5,5 veces para las células CD34+/KDR+ ( $p < 0,001$ ) y de 3,5 veces para las células CD133+/KDR+ a partir de 210 minutos de ejercicio ( $p < 0,001$ ) de forma tiempo dependiente, con retorno a los niveles basales después de 24 horas<sup>22</sup>. Los niveles de VEGF-C aumentaron en el día siguiente a un maratón y fueron mayores que en el ejercicio máximo ( $p < 0,05$ )<sup>8</sup>. Después de 10 minutos de ejercicio en cicloergómetro<sup>22</sup>, los niveles plasmáticos de VEGF mostraron aumento máximo de 1,9 vez ( $79,8 \pm 15,4$  pg/ $\text{mL}$  vs.  $132,6 \pm 32,1$  pg/ $\text{mL}$ ;  $p < 0,05$ ), presentando correlación significativa con el número de células CD133+/KDR+ ( $r = 0,67$ ;  $p = 0,0045$ )<sup>22</sup>. Entre tanto, Adams et al<sup>7</sup> mostraron disminución de los niveles plasmáticos de VEGF después del maratón ( $48,9 \pm 8,0$  vs.  $34,0 \pm 7,5$  pg/ $\text{mL}$ ;  $p < 0,05$ ), aunque sin correlación con el número de células CD34+/VEGFR2+.

### Ejercicio de intensidad máxima

Cuatro estudios evaluaron el efecto de una sesión única de ejercicio máximo en el número de CPE<sup>8,21,23,24</sup> (tab. 2b).

Tabla 2a – Resultados de estudios que utilizaron protocolo de ejercicio de larga/ultra larga duración

Estudio	Colecta de sangre	Identificación de las CPE	Protocolo de ejercicio	Variables/ Métodos	Resultados	Correlación (intervención/desenlace)
Adams et al., 2008 <sup>7</sup>	Antes y inmediatamente después del maratón	Citometría: CD34+/VEGFR2+	Maratón de Dusseldorf 2006, duración $\cong$ 4h	VEGF y EGF plasmáticos/ ELISA	Sin alteración en el nº de células CD34+/VEGFR2+ y $\downarrow$ VEGF después del maratón	Sin correlación
Bonsignore et al., 2010 <sup>8</sup>	2-3 días antes, inmediatamente después de y 18-20h después de la maratón	Citometría: CD34+/KDR+; Cultivo: CAC	Maratón Internacional de Palermo 2005, duración $\cong$ 3h30min	VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D plasmáticos/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ ( $\cong$ 2x), $\uparrow$ CAC (3x) inmediatamente después de y $\uparrow$ VEGF-C (18-20h después de)	-
Gousssetis et al., 2009 <sup>19</sup>	Antes, inmediatamente después de y 48h después de la carrera	Cultivo: UFC-CE	Carrera de ultra distancia de 246 km (Spartathon), duración $\cong$ 32h8min	-	$\uparrow$ UFC-CE (11x) inmediatamente después de y 48h después de la carrera	-
Möbius-Winkler et al., 2009 <sup>22</sup>	Antes, durante (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240min) y después de (30, 60, 120, 1.440min) el ejercicio	Citometría: CD34+/KDR+ y CD133+/KDR+	Test en cicloergómetro a 70% del A durante 4h	VEGF plasmático/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ (5,5x), $\uparrow$ CD133+/KDR+ (3,5x) y $\uparrow$ VEGF después de 10min	Correlación entre células CD133+/KDR+ y VEGF ( $r = 0,67$ )

CPE – células progenitoras endoteliales; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciación 34; VEGFR2 – en inglés, receptor 2 del factor de crecimiento endotelio vascular; VEGF – en inglés, factor de crecimiento endotelio vascular (tipos A, C, D); EGF – en inglés, factor de crecimiento epidérmico; ELISA – en inglés, ensayo de inmunoabsorbencia; KDR – en inglés, dominio de inserción de la quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelio vascular; CAC – en inglés, células angiogénicas circulantes; UFC-CE – unidad formadora de colonia de célula endotelial; CD 133 – cluster de diferenciación 133; A – umbral anaeróbico.

Tabla 2b – Resultados de estudios que utilizaron protocolo de ejercicio de intensidad máxima

Estudio	Colecta de sangre	Identificación de las CPE	Protocolo de ejercicio	Variables/ Métodos	Resultados	Correlación (intervención/desenlace)
Bonsignore et al., 2010 <sup>8</sup>	Antes y después de la carrera (3-5min)	Citometría: CD34+/KDR+ Cultivo: CAC	Carrera de 1.500m (duración: 5min $\pm$ 35s); frecuencia cardíaca máxima 178 $\pm$ 6 bpm	VEGF- A, VEGF-C y VEGF-D plasmáticos/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ ( $\cong$ 3x), $\uparrow$ CAC y $\uparrow$ VEGF-C	-
Thijssen et al., 2006 <sup>21</sup>	Antes y 10min después de ejercicio	Citometría: CD45-/CD34+/VEGFR2+	TCPE máximo en cicloergómetro – Jóvenes: 20W /min y Añosos: 10W/min	VEGF plasmático/ ELISA	Sin alteración en el nº de células CD34+/VEGFR2+ entre jóvenes y añosos (entrenados o sedentarios); sin alteración VEGF en jóvenes y añosos (entrenados o sedentarios)	Sin correlación
Van Craenenbroeck et al., 2008 <sup>23</sup>	Antes y 10min después del pico del ejercicio	Citometría: CD34+/KDR+; Cultivo: UFC-CE	TCPE máximo en cicloergómetro la 40W y incremento de 20W/min	Nitrato-Nitrito plasmáticos/ Colorimetría; VEGF/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ después de ejercicio en ambos grupos	Sin correlación
Yang et al., 2007 <sup>24</sup>	Antes y 30min después de ejercicio	Citometría: CD34+/KDR+; Cultivo: Lectina UEA-1+-FITC/ Dil-acLDL+	TCPE máximo en cinta (protocolo de Bruce modificado, duración de 9,6 $\pm$ 2,2min y 10,2 MET)	Nitrato-Nitrito plasmáticos y en cultivo/ Colorimetría; VEGF/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+, $\uparrow$ Lectina UEA-1-FITC+/Dil-acLDL+ y $\uparrow$ nitrato-nitrito plasmáticos después de ejercicio	Correlación positiva entre CPE y niveles de nitrato-nitrito plasmáticos ( $r = 0,70$ )

CPE – células progenitoras endoteliales; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciación 34; VEGFR2 – en inglés, receptor 2 del factor de crecimiento endotelio vascular; VEGF – en inglés, factor de crecimiento endotelio vascular (tipos A, C, D); ELISA – en inglés, ensayo de inmunoabsorbencia; KDR – en inglés, dominio de inserción de la quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelio vascular; CAC – en inglés, células angiogénicas circulantes; UFC-CE – unidad formadora de colonia de célula endotelial; UEA-1- FITC – en inglés, aglutinina Ulex Europeus tipo 1- conjugado con Isotiocianato de fluoresceína; Dil-acLDL – en inglés lipoproteína de baja densidad acetilada marcado con 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina; TCPE – Test cardiopulmonar de esfuerzo; MET – en inglés, equivalente metabólico; W – watts; bpm – batimentos por minuto; CD45 – cluster de diferenciación 45.

Tabla 2c – Resultados de estudios que utilizaron protocolo de ejercicio de intensidad submáxima con duración menor que 1h

Estudio	Colecta de sangre	Identificación de las CPE	Protocolo de ejercicio	Variables/ Métodos	Resultados	Correlación (intervención/desenlace)
Cubbon et al., 2010 <sup>26</sup>	Antes y 20min después de ejercicio	Citometría: CD34+/KDR+; CD133+/CD34+/KDR+	Test en cicloergómetro a 80% del A durante 30min	Bloqueo de la eNOS (L-NMMA)	↑CD34+/KDR+, ↑CD133/CD34+/KDR después de ejercicio; ↓CD34+/KDR+; ↓CD133+/CD34+/KDR+ después de infusión de L-NMMA	-
Jenkins et al., 2009 <sup>17</sup>	Antes y 30min después de ejercicio	Cultivo: UFC-CE	Test en cinta a 75-80% del VO <sub>2</sub> máx. durante 30min	NO intracel/ colorante fluorescente; Estrés oxidativo/ PCR-RT	↑UFC-CE en el grupo entrenado después de ejercicio; ↓NADPH-ox (gp91 <sup>phox</sup> ) en ambos grupos después de ejercicio; ↑NOi y ↓NADPH-ox (p47 <sup>phox</sup> ) en el grupo activo, después de ejercicio	-
Laufs et al., 2005 <sup>27</sup>	Antes y 10min, 30min, 2h, 6h y 24h después del ejercicio	Citometría: CD34+/KDR+; Cultivo: UFC-CE	Carreras: 1) ↑ intensidad: 30min, 100% del A; 2) Moderada intensidad: 30min, 80% del A; 3) Corta y moderada intensidad: 10min, 80% del A	VEGF plasmático/ ELISA	↑CD34+/VEGFR2+ 30min después de carrera de alta y moderada intensidades; ↑UFC-CE 30min después de carrera de alta intensidad	Sin correlación
Lockard et al., 2010 <sup>18</sup>	Antes y 30min después de ejercicio	Citometría: CD34+/VEGFR2+; Cultivo: UFC-CE	Test en cinta (75% ± 5% del VO <sub>2</sub> máx.) durante 30min	-	Sin alteración n° de células CD34+/VEGFR2+ o UFC-CE antes y después de ejercicio	-
Thorell et al., 2009 <sup>25</sup>	Antes, 1h, 24h y 48h después de ejercicio	Cultivo: colonias de célula endotelial de crecimiento tardío	Spinning en bicicleta a 80% de la frecuencia cardíaca máxima durante 1h	VEGF plasmático/ ELISA	↑n° de colonias tardías (2x) 1h después de ejercicio	Correlación entre n° de colonias y los niveles de VEGF (r = 0,903)

CPE – células progenitoras endoteliales; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciación 34; VEGFR2 – en inglés, receptor 2 del factor de crecimiento endotelio vascular; VEGF – en inglés, factor de crecimiento endotelio vascular (tipos A, C, D); ELISA – en inglés, ensayo de inmunoabsorbencia; KDR – en inglés, dominio de inserción de la quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelio vascular; UFC-CE – unidad formadora de colonia de célula endotelial; CD 133 – cluster de diferenciación 133; A – umbral anaeróbico; eNOS – en inglés óxido nítrico sintasa endotelial; L-NMMA – N5-[imino(methylamino)methyl]-L-ornithine citrate; NO intracel – óxido nítrico intracelular; NADPH oxidasa – en inglés, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; PCR-RT – en inglés, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; VO<sub>2</sub> máx. – consumo máximo de oxígeno.

En el estudio de Yang et al<sup>24</sup> hubo aumento significativo de células CD34+/KDR+ (p < 0,05) y de células lectina UEA1-FITC+/Dil-acLDL+ (p < 0,05) en los 30 minutos después de la realización de un TCPE en cinta. En individuos entrenados, las células CD34+/KDR+ aumentaron tres veces (p < 0,01) después del término de una carrera de 1.500 m<sup>8</sup>. Los niveles de CAC también aumentaron significativamente después de la carrera de 1.500 m<sup>8</sup> (p < 0,005). Resultados semejantes fueron mostrados por Van Craenenbroeck et al<sup>23</sup>, que revelaron aumento de 76% de las células CD34+/KDR+ en jóvenes con edades de 24 ± 1 años (15,4 ± 10,7 vs. 27,2 ± 13,7 células/mL; p = 0,01) y aumento de 69% en adultos con edades de 36 ± 9 años (30,9 ± 14,6 vs. 52,5 ± 42,6 células/mL; p = 0,03); entre tanto, no ocurrió cambio significativo en el porcentual de UFC-CE (11,9 ± 10,9 vs. 9,0 ± 8,3 UFC-CE; p = 0,2).

Solamente en el estudio de Thijssen et al<sup>21</sup> no hubo cambio en el número de CPE después de TCPE entre jóvenes y añosos entrenados y sedentarios (p > 0,05).

En la mayoría de los estudios no hubo cambio significativo en los niveles plasmáticos de VEGF después de sesión única de ejercicio máximo<sup>21,23,24</sup>, aunque en el estudio de Bonsignore et al<sup>8</sup>, los niveles plasmáticos de VEGF-C (7,3 ± 1,8 vs. 8,8 ± 1,7 pg/mL; p < 0,001) aumentaron después de una carrera de 1.500 m (tab. 2b).

El aumento de los niveles plasmáticos de Óxido Nítrico (NO) fue observado 30 minutos después de la realización de un TCPE en cinta por el estudio de Yang et al<sup>24</sup> (p < 0,05). Además de eso, el análisis por regresión lineal reveló correlación positiva (r = 0,70; p < 0,05) entre el aumento de CPE y los niveles de NO<sup>24</sup>.

### Ejercicio de intensidad submáxima con duración menor que una hora

De los cinco trabajos<sup>17,18,25-27</sup> que evaluaron el efecto de una sesión de ejercicio submáximo sobre el número de CPE o de UFC-CE (tab. 2c), tres estudios<sup>17,18,27</sup> utilizaron un protocolo basado en una carrera en pista de 400 m o en cinta con 30 minutos de duración e intensidad de ejercicio entre 68% y 82% del  $\text{VO}_2$  máximo, aproximadamente.

A pesar de que Lockard et al<sup>18</sup> no hayan encontrado alteración en el número de células  $\text{CD34+}/\text{VEGFR2+}$  ( $p > 0,05$ ) y en las UFC-CE ( $p > 0,05$ ) después de 30 minutos de ejercicio con intensidad de  $75 \pm 5\%$  del  $\text{VO}_2$  máximo, la mayoría de los estudios no parece corroborar ese hallazgo. Jenkins et al<sup>17</sup> mostraron que, en hombres entrenados, las UFC-CE aumentaron significativamente después de 30 minutos de ejercicio submáximo ( $p = 0,02$ ). El ejercicio moderado o intenso (80% y 100% del umbral anaeróbico, respectivamente) de misma duración aumentó el número de CPE circulantes ( $\text{CD34+}/\text{VEGFR2+}$  y lectina UEA 1-FITC+/Dil-acLDL+) con pico de respuesta entre 10 y 30 minutos después del término de la sesión del ejercicio ( $p < 0,01$ ). Las UFC-CE también aumentaron después de 30 minutos de carrera de alta intensidad<sup>27</sup> ( $p < 0,05$ ). Además de eso, una sesión de ejercicio en cicloergómetro, con duración de 30 minutos a 80% del umbral anaeróbico<sup>26</sup>, provocó el aumento del número de células  $\text{CD34+}/\text{KDR+}$  y  $\text{CD133+}/\text{CD34+}/\text{KDR+}$  en individuo caucásicos europeos ( $85,4 \pm 1,3\%$  y  $73,9 \pm 9,1\%$ ; respectivamente), así como en asiáticos ( $53,2 \pm 6,9\%$  y  $48,3 \pm 8,8\%$ ; respectivamente) 20 minutos después del término de la sesión. En otro estudio<sup>25</sup>, una sesión única de *spinning*, con duración media de  $44,3 \pm 3,4$  minutos y una frecuencia cardíaca que varió entre 77%-95% de la frecuencia cardíaca máxima, fue capaz de doblar el número de colonias de célula endotelial de crecimiento tardío, otro tipo de colonias de CPE. Además de eso, los niveles de VEGF presentaron correlación significativa con el número de colonias de célula endotelial de crecimiento tardío ( $r = 0,903$ )<sup>25</sup>. Los efectos de la sesión única de *spinning* disminuyeron a lo largo del tiempo con retorno a los niveles basales después de 48 horas.

En hombres entrenados, el ejercicio redujo, agudamente, los niveles de RNA mensajero (RNAm) de la NADPH oxidasa ( $\text{gp91}^{\text{phox}}$ ) en UFC-CE<sup>17</sup> ( $p = 0,02$ ). En hombres activos, hubo aumento de la producción de NO intracelular ( $p = 0,004$ ) y reducción de la expresión de la subunidad  $\text{p47}^{\text{phox}}$  de la NADPH oxidasa ( $p < 0,05$ ), pero sin diferencia para otros marcadores de estrés oxidativo<sup>17</sup> ( $p > 0,05$ ). La infusión de L-NMMA, un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), redujo el número de CPE ( $\text{CD34+}/\text{KDR+}$ :  $-3,3\%$  vs.  $68,4\%$ ;  $p < 0,001$ ;  $\text{CD133+}/\text{CD34+}/\text{KDR+}$ :  $0,7\%$  vs.  $71,4\%$ ;  $p < 0,001$ ). Además de eso, un análisis por regresión lineal mostró una correlación positiva entre la vasodilatación mediada por el flujo y las células  $\text{CD34+}/\text{KDR+}$  ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,02$ ) y  $\text{CD133+}/\text{CD34+}/\text{KDR+}$  ( $r = 0,39$ ;  $p < 0,04$ )<sup>26</sup>.

### Discusión

Recientes trabajos<sup>15,24</sup> demostraron que la mejora de la función endotelial inducida por el ejercicio se debe, en parte,

por la Movilización de CPE para la circulación periférica, donde actúan en los procesos de neovascularización y de reparación endotelial<sup>15</sup>. Por esa razón, el ejercicio físico es un importante método para promover la salud del sistema cardiovascular, tanto en individuo sanos<sup>28</sup> como en individuo con factores de riesgo cardiovascular<sup>29,30</sup>.

### Ejercicio de larga/ultra larga duración

Los maratones, medio maratones y carreras de ultra distancia son modelos de inflamación inducida que estimulan el aumento de los niveles circulantes de mediadores pro y antiinflamatorios<sup>31</sup>, promoviendo la liberación, la migración y la diferenciación de las células tronco de la médula ósea<sup>32</sup>. Ese tipo de ejercicio también aumenta los niveles plasmáticos de citocinas y de marcadores de activación endotelial, ofreciendo una oportunidad de evaluar los mecanismos fisiológicos relacionados a la reparación vascular, antes que un daño tisular irreversible haya ocurrido<sup>33</sup>.

Los resultados mostraron que los ejercicios de larga/ultra larga duración aumentan significativamente la concentración de células progenitoras, especialmente las endoteliales, y de leucocitos<sup>8,19,22</sup>. Los niveles plasmáticos de interleucina-6 se mostraron elevados durante y después de ejercicio de larga/ultra larga duración, evidenciando su carácter inflamatorio<sup>8,19</sup>.

Aun en ese contexto, los mayores niveles plasmáticos de VEGF fueron verificados después de ese tipo de ejercicio. Se cree que los niveles elevados de ese factor estén asociados a la presencia de hipoxia en los tejidos en esas condiciones, lo que favorecería el estímulo de Movilización de las CPE y la reparación endotelial. Por lo tanto, ese aumento de VEGF parece demostrar un mecanismo de adaptación fisiológica al ejercicio de larga/ultra larga duración, y sugiere que hay una correlación positiva entre la intensidad del ejercicio y la liberación de factores de crecimiento<sup>8</sup>.

La duración del ejercicio, a su vez, parece estar asociada a la permanencia de los efectos del mismo sobre las CPE. Protocolos de ejercicio con aspecto extremo<sup>19</sup> presentaron respuestas más duraderas (hasta 48 horas después del término de la sesión de ejercicio) que maratones (hasta 24 horas después del término de la sesión de ejercicio)<sup>8</sup>.

Finalmente, se cree que la diferencia de edad entre las poblaciones de los estudios analizados pueda explicar los resultados contradictorios obtenidos, una vez que la edad influencia el número y la funcionalidad de las CPE<sup>34</sup>.

### Ejercicio de intensidad máxima

Los ejercicios de intensidad máxima son caracterizados por un gran aumento en el estrés de corte vascular<sup>35</sup>, el cual puede ser considerado un efecto subagudo del ejercicio físico<sup>28</sup>. La mayoría de los resultados mostró que una única sesión de ejercicio máximo parece aumentar el número de CPE<sup>8,23,24</sup>, los niveles de NO plasmático<sup>24</sup>, así como los niveles plasmáticos del VEGF-C<sup>8</sup>. Entre tanto, una correlación positiva fue encontrada apenas entre el aumento de CPE y los niveles de NO<sup>24</sup>. Además de eso, la magnitud del incremento utilizado en los protocolos de ejercicios parece contribuir a resultados más significativos<sup>24</sup>.

Algunos estudios que utilizaron condiciones semejantes de ejercicio y perfil poblacional<sup>21,23,24</sup> mostraron resultados muy diferentes para el número de CPE en la condición basal. Al menos parte de esa heterogeneidad resulta de la ausencia de un protocolo estandarizado para la cuantificación, identificación y análisis de las CPE. Por esa razón, se vuelve difícil comparar y consolidar los resultados de los diferentes estudios, siendo ese el mayor desafío metodológico en el avance del conocimiento en esa área.

### Ejercicio de intensidad submáxima con duración menor que una hora

Sesiones de ejercicio de intensidad submáxima corresponden a sesiones sucesivas que componen el entrenamiento; por lo tanto, el estudio de las respuestas fisiológicas a ese tipo de ejercicio puede contribuir a la comprensión del proceso global de adaptación endotelial al entrenamiento físico<sup>36</sup>.

En jóvenes, el ejercicio de intensidad submáxima promovió aumento significativo de las UFC-CE, de las CPE o de colonias de célula endotelial de crecimiento tardío. Además de eso, se verificó que los niveles de CPE circulantes no variaron en respuesta a un ejercicio de mayor intensidad y misma duración<sup>27</sup>. Entre tanto, un protocolo fatigante, que combina intensidad submáxima y mayor duración (cerca de una hora de duración), documentó un efecto más duradero del ejercicio sobre las CPE, sendo observado hasta 48 horas después del término de la sesión. Además de eso, ese protocolo se correlacionó fuertemente con los niveles plasmáticos de VEGF ( $r = 0,903$ )<sup>25</sup>.

En razón de la gran variabilidad interindividual encontrada, no fueron verificadas diferencias significativas en el número de CPE o de UFC-CE después de ejercicio, en atletas añosos<sup>18</sup>.

En cuanto a la influencia de la condición física sobre las CPE, los estudios son controvertidos. Jóvenes entrenados<sup>17</sup> mostraron aumento significativo de UFC-CE. Mientras tanto, el aumento de células CD34+/KDR+ o CD34+/VEGFR2+ fue observado tanto en individuos sedentarios<sup>26</sup> como en individuos entrenados<sup>27</sup>.

El principal mecanismo envuelto en la Movilización de las CPE después de la realización de ejercicio submáximo parece estar asociado a la biodisponibilidad de NO. En hombres activos, el ejercicio promovió una disminución de la expresión de la NADPH oxidasa, importante factor causador de estrés oxidativo en el sistema cardiovascular y un aumento de los niveles de NO intracelular en las UFC-CE<sup>17</sup>. En individuos sedentarios, el ejercicio promovió reducción significativa de la Movilización de células CD34+/VEGFR2+ después del bloqueo de la eNOS por infusión con L-NMMA<sup>26</sup>. Esos datos sugieren que la NADPH oxidasa puede ser uno de los mecanismos envueltos en la inhibición de la producción de NO intracelular en las UFC-CE<sup>17</sup>.

Hasta el momento, algunos estudios<sup>9,26,35</sup> han demostrado uno de los posibles mecanismos por el cual la producción de NO inducida agudamente por el ejercicio contribuye al aumento de CPE. En esos estudios, los autores proponen que el ejercicio promueve aumento del estrés de corte en el endotelio, elevando los niveles de calcio intracelular y,

consecuentemente, activando la eNOS. La activación de esa enzima, a su vez, promueve el aumento del NO, la activación de la metaloproteínasa 9 y la liberación del ligante Kit soluble, siendo este crucial para la Movilización de CPE de la médula ósea a la circulación periférica<sup>26</sup>.

A pesar del hecho de que un tejido isquémico es por definición un tejido patológico y, por esa razón, está ausente en individuo sanos, los ejercicios de larga y ultra larga duración son modelos de isquemia fisiológica, pues provocan cambios en el metabolismo glucolítico anaeróbico, además de generar estrés oxidativo<sup>23</sup>. Las especies reactivas del oxígeno son esenciales para la hipoxia<sup>37</sup>. El factor inducido por hipoxia-1 es activado después de sesiones únicas de ejercicio<sup>38</sup>, estimulando la expresión génica de importantes moléculas movilizadoras de CPE, como el VEGF<sup>10</sup>. En presencia de VEGF ocurre la activación de la eNOS, el aumento del NO y, así, la Movilización de CPE de la médula ósea<sup>26</sup>. Además de esas condiciones, el NO también es la molécula clave en los ejercicios de menor duración y el aumento en su biodisponibilidad parece depender, especialmente, de dos mecanismos: en el primero, la activación de la proteína quinasa 3 mediada por el aumento del estrés de corte activa la eNOS y esa aumenta la producción de NO<sup>39</sup>. En el segundo mecanismo, el ejercicio reduce la expresión de NADPH, aumentando la biodisponibilidad de NO con consecuente Movilización de CPE de la médula ósea. Por lo expuesto, podemos sugerir que las sesiones únicas de ejercicio de intensidad y duraciones diferentes movilizan las CPE a la sangre periférica por mecanismos diferentes entre tanto, el NO parece ser una molécula común en ambas vías de Movilización.

### Conclusión

La Movilización de células progenitoras endoteliales fue más acentuada en el ejercicio de larga/ultra larga duración y parece estar asociada a los niveles plasmáticos de factor de crecimiento endotelio vascular. Mientras los ejercicios máximo y submáximo con hasta una hora de duración provocan aumento, en menor magnitud, del número de células progenitoras endoteliales en la circulación, aunque el mecanismo principal de Movilización parece ser la biodisponibilidad de óxido nítrico.

### Agradecimientos

Este trabajo tuvo el apoyo financiero de las siguientes instituciones: Capes, Faperj, CNPq, Finep y Labs D'Or.

### Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

### Fuentes de Financiación

Capes, Faperj, CNPq, Finep y Labs D'Or financiarón el presente estudio.

### Vinculación Académica

Este artículo forma parte de tesis de Doctorado de Natália Galito Rocha, por la Universidade Federal Fluminense.



### Referencias

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
2. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-9.
3. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.
4. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):741-52.
5. Sauter B, Foedinger D, Sterniczky B, Wolff K, Rappersberger K. Immunoelectron microscopic characterization of human dermal lymphatic microvascular endothelial cells. Differential expression of CD31, CD34, and type IV collagen with lymphatic endothelial cells vs blood capillary endothelial cells in normal human skin, lymphangioma, and hemangioma in situ. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(2):165-76.
6. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64(1):1-8.
7. Adams V, Linke A, Breuckmann F, Leineweber K, Erbs S, Krankel 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.
8. Bonsignore MR, Morici G, Riccioni R, Huertas A, Petrucci E, Veca M, et al. Hemopoietic and angiogenic progenitors in healthy athletes: different responses to endurance and maximal exercise. *J Appl Physiol*. 2010;109(1):60-7.
9. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109(2):220-6.
10. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18(14):3964-72.
11. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):296-301.
12. Kokkinos P, Myers J, Faselis C, Panagiotakos DB, Doulas M, Pittaras A, et al. Exercise capacity and mortality in older men: a 20-year follow-up study. *Circulation*. 2010;122(8):790-7.
13. Shi L, Morrison JA, Wiecha J, Horton M, Hayman LL. Healthy lifestyle factors associated with reduced cardiometabolic risk. *Br J Nutr*. 2011;105(5):747-54.
14. Seligman BG, Polanczyk CA, Santos AS, Foppa M, Junges M, Bonzanini L, et al. Intensive practical lifestyle intervention improves endothelial function in metabolic syndrome independent of weight loss: a randomized controlled trial. *Metabolism*. 2011 Jun 21. [Epub ahead of print].
15. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593-600.
16. Giacomini MK, Cook DJ. Users' guides to the medical literature: XXIII. Qualitative research in health care A. Are the results of the study valid? Evidence-Based Medicine Working Group. *JAMA*. 2000;284(3):357-62.
17. Jenkins NT, Witkowski S, Spangenburg EE, Hagberg JM. Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(5):H1798-805.
18. Lockard MM, Witkowski S, Jenkins NT, Spangenburg EE, Obisesan TO, Hagberg JM. Thrombin and exercise similarly influence expression of cell cycle genes in cultured putative endothelial progenitor cells. *J Appl Physiol*. 2010;108(6):1682-90.
19. Goussetis E, Spiropoulos A, Tsironi M, Skenderi K, Margeli A, Graphakos S, et al. Spartathlon, a 246 kilometer foot race: effects of acute inflammation induced by prolonged exercise on circulating progenitor reparative cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(3):294-9.
20. Bonsignore MR, Morici G, Santoro A, Pagano M, Cascio L, Bonanno A, et al. Circulating hematopoietic progenitor cells in runners. *J Appl Physiol*. 2002;93(5):1691-7.
21. Thijssen DH, Vos JB, Verseyden C, van Zonneveld AJ, Smits P, Sweep FC, et al. Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell*. 2006;5(6):495-503.
22. Mobius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, et al. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol*. 2009;107(6):1943-50.
23. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. 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):1006-13.
24. Yang Z, Wang JM, Chen L, Luo CF, Tang AL, Tao J. Acute exercise-induced nitric oxide production contributes to upregulation of circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects. *J Hum Hypertens*. 2007;21(6):452-60.
25. Thorell D, Borjesson M, Larsson P, Ulfhammer E, Karlsson L, DuttaRoy S. Strenuous exercise increases late outgrowth endothelial cells in healthy subjects. *Eur J Appl Physiol*. 2009;107(4):481-8.
26. Cubbon RM, Murgatroyd SR, Ferguson C, Bowen TS, Rakobowchuk M, Baliga V, et al. Human exercise-induced circulating progenitor cell mobilization is nitric oxide-dependent and is blunted in South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):878-84.
27. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner C, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005;12(4):407-14.
28. Bousquet-Santos K, Soares PP, Nobrega AC. Subacute effects of a maximal exercise bout on endothelium-mediated vasodilation in healthy subjects. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(4):621-7.
29. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(4):684-90.
30. Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krankel N, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation*. 2005;111(25):3391-9.
31. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*. 1999;515 (Pt 1):287-91.
32. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45(3):321-5.
33. Margeli A, Skenderi K, Tsironi M, Hantzi E, Matalas AL, Vrettou C, et al. Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(7):3914-8.
34. 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):847-52.

35. Padilla J, Harris RA, Rink LD, Wallace JP. Characterization of the brachial artery shear stress following walking exercise. *Vasc Med.* 2008;13(2):105-11.
36. Nobrega ACL. The subacute effects of exercise: concept, characteristics, and clinical implications. *Exerc Sport Sci Rev.* 2005;33(2):84-7.
37. Schroder K, Kohnen A, Aicher A, Liehn EA, Buchse T, Stein S, et al. NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Circ Res.* 2009;105(6):537-44.
38. Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol.* 2006;96(4):363-9.
39. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003;107(25):3152-8.