

Mobilização de Células Progenitoras Endoteliais com o Exercício em Sadios: uma Revisão Sistemática

Mobilization of Endothelial Progenitor Cells with Exercise in Healthy Individuals: a Systematic Review

Jemima Fuentes Ribeiro da Silva¹, Natália Galito Rocha¹, Antonio Claudio Lucas da Nóbrega^{1,2}

Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares - Universidade Federal Fluminense¹; Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal Fluminense², Niterói, RJ, Brasil

O exercício físico mobiliza Células Progenitoras Endoteliais (CPE) para o sangue periférico. Entretanto, esse efeito parece depender de características do exercício, como duração e intensidade.

O objetivo do presente trabalho foi verificar, por meio de revisão sistemática, o impacto de uma única sessão de exercício aeróbico sobre a mobilização de CPE em indivíduos sadios e os potenciais mecanismos envolvidos.

A busca bibliográfica foi realizada nas bases de dados eletrônicas SciELO, LILACS, Cochrane, ClinicalTrials.gov, SPORTDiscus e Medline, em maio de 2011. Dos 178 estudos inicialmente identificados, 12 atenderam aos critérios de inclusão e foram classificados quanto à qualidade mediante critérios da escala PEDro.

A magnitude e a duração da resposta de mobilização das CPE foram maiores após a realização de exercícios de longa/ultralonga duração e estão correlacionadas com níveis plasmáticos de fator de crescimento endotélio vascular (VEGF). O pico de mobilização dessas células em resposta a uma sessão de exercício máximo ou submáximo, com duração de até uma hora, ocorre no período imediatamente após o esforço até uma hora após sua interrupção. Um possível mecanismo é a biodisponibilidade do Óxido Nítrico (NO). A idade dos indivíduos e a intensidade do exercício parecem interferir na resposta de mobilização das CPE.

Exercícios de longa/ultralonga duração promovem mobilização mais acentuada das CPE quando comparados a exercícios máximos ou submáximos. Os mecanismos envolvem a liberação do VEGF em exercícios de longa/ultralonga duração e a biodisponibilidade de NO em exercícios máximo e submáximo com até uma hora de duração.

Palavras-chave

Exercício, células progenitoras endoteliais, mobilização de células.

Introdução

As Células Progenitoras Endoteliais (CPE), descritas em 1997 por Asahara e cols.¹, constituem uma população heterogênea de células circulantes no sangue periférico¹ cuja origem encontra-se em múltiplos precursores, incluindo hemangioblastos¹, precursores não hematopoiéticos, células monocíticas² ou células-tronco residentes nos tecidos³. Essas células desempenham importante função no reparo vascular e na formação de novos vasos em razão de sua capacidade de proliferar, migrar, se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em células endoteliais¹, bem como incorporar-se ao endotélio preexistente^{2,4}. Por isso, apresentam, fenotipicamente, tanto características morfofuncionais de células hematopoiéticas quanto de células endoteliais maduras⁵.

As CPE são raras, representando cerca de 0,01% a 0,0001% da fração mononuclear no sangue periférico⁶. Entretanto, diversos estímulos são capazes de mobilizá-las da medula óssea, elevando-as temporariamente na circulação periférica, e dentre esses estímulos destaca-se o exercício físico⁷⁻⁹. Uma vez na circulação periférica, as CPE secretam fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)¹⁰ e o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF)¹¹, capazes de estimular paracrinamente os processos de neovascularização e angiogênese¹.

A prática regular de exercícios físicos contribui para a redução de cerca de 30% da mortalidade por doenças cardiovasculares¹². Como a diminuição de fatores de risco cardiometabólico clássicos como hiperlipidemia, hipertensão e resistência à insulina explica apenas aproximadamente 40% da redução da mortalidade induzida por exercícios¹³, variáveis relacionadas diretamente ao endotélio poderiam ajudar a explicar por que e como os exercícios físicos previnem, diminuem a progressão e reduzem a mortalidade decorrente da presença de doenças cardiovasculares¹⁴.

Um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo é a mobilização de CPE para o sangue periférico⁹. Contudo, diferentes tipos, durações e intensidades de exercício podem promover distintas respostas e, consequentemente, alterar a biodisponibilidade e funcionalidade das CPE. Assim, revisamos de forma sistemática o impacto de uma sessão de exercício aeróbico na mobilização de CPE em indivíduos sadios e os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo.

Correspondência: 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, Brasil
E-mail: anobrega@id.uff.br

Artigo recebido em 03/06/11; revisado recebido em 13/07/11; aceito em 18/07/11.

Métodos

Seleção dos estudos

A busca bibliográfica foi realizada no mês de maio de 2011, por dois avaliadores independentes (JFRS e NGR) por meio das bases de dados eletrônicas SciELO, Cochrane, LILACS, ClinicalTrials.gov, SPORTDiscus e Medline. Os trabalhos foram consultados utilizando todos ou parte dos descritores identificados a seguir em inglês e sua correspondência em português: (*"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*).

Foram identificados 178 estudos em todas as bases de dados eletrônicas. Após aplicação dos termos *NOT disease* e *NOT review* à busca, foram selecionados 56 estudos na base *Medline*, quatro na base *ClinicalTrials*.

gov, dois na base *SciELO*, dois na base *Cochrane*, um na base *SPORTDiscus* e nenhum na base *LILACS*. Desses, dois estudos foram encontrados em duas bases de dados distintas (*Medline* e *Cochrane*), e um estudo foi encontrado em três bases de dados distintas (*Medline*, *ClinicalTrials.gov* e *SPORTDiscus*).

Mediante uma análise manual, foram excluídos estudos cujos participantes fossem crianças ou adolescentes ($n = 02$); acometidos por doença, inflamação, alteração metabólica ou fizessem uso de drogas ($n = 27$); estudos que não avaliassem a intervenção ou o desfecho de interesse, ou seja, a intervenção não fosse uma sessão única de exercício físico ou a população celular analisada não correspondesse ao perfil de CPE, conforme critérios de inclusão ($n = 19$); e estudo de revisão ($n = 01$) (Figura 1).

Quando o título e o *abstract* (resumo) da publicação sugeriam que o estudo fosse potencialmente elegível para a inclusão, uma cópia do texto completo era obtida e o estudo era classificado mediante a aplicação de cinco critérios de inclusão: 1. Ano de publicação: a partir de 1997, data da primeira publicação sobre CPE; 2. Delineamento dos estudos: coorte, transversais, ensaios clínicos, ensaios clínicos controlados e ensaios clínicos controlados randomizados; 3. População do estudo:

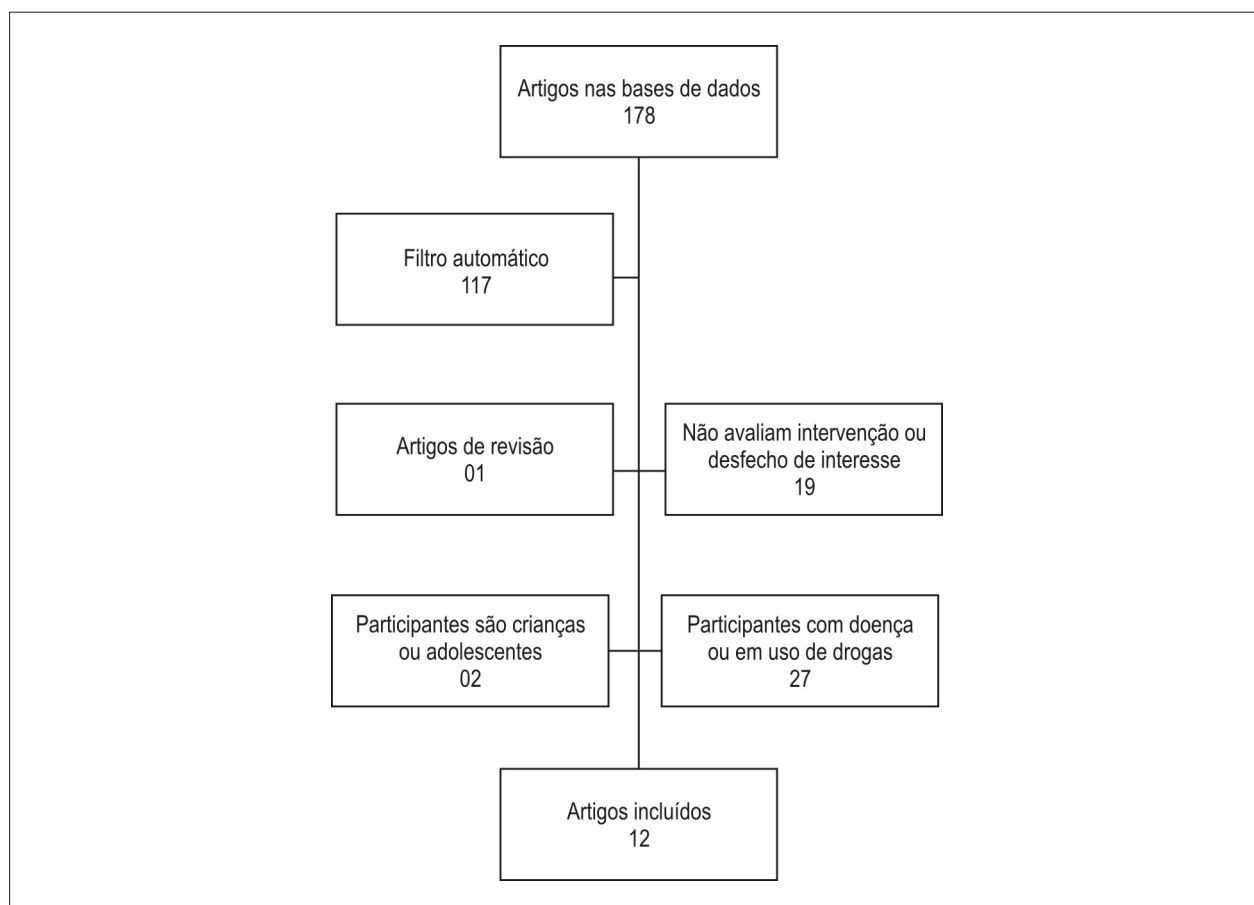


Fig. 1 - Fluxograma de seleção do estudo.

Artigo de Revisão

adultos saudáveis (humanos ou animais); 4. Intervenção: uma sessão de exercício físico aeróbico; e 5. Desfecho de interesse: avaliação quantitativa das CPE, caracterizadas como positivas para CD133 (AC133) ou CD34 (sca-1) e VEGFR2 (KDR ou flk-1), ou unidades formadoras de colônia de célula endotelial (UFC-CE)¹⁵.

A qualidade dos estudos foi avaliada por meio da escala PEDro¹⁶, na qual estudos com um escore maior ou igual a quatro são classificados como de alta qualidade. Os critérios adotados foram: 1. Critérios de inclusão bem definidos; 2. Alocação aleatória entre os grupos; 3. Descrição das características demográficas e o tamanho

da amostra (≥ 8 indivíduos); 4. Cego (os participantes ou os avaliadores ou as análises de resultados foram feitos de forma cega); 5. Método suficiente (quando o protocolo de exercício foi descrito detalhadamente ou a análise celular foi realizada por pelo menos um método quantitativo ou qualitativo); 6. Mensurações (foram obtidas em mais de 85% dos indivíduos inicialmente alocados nos grupos para pelo menos um resultado-chave); 7. Análise estatística (foi descrito, ao menos, um resultado das comparações estatísticas entre grupos ou entre momentos); 8. Análise de regressão (para avaliar a associação entre as variáveis intervenção e desfecho) (Tabela 1).

Tabela 1 – Qualidade metodológica dos estudos

Estudo	Critérios inclusão	Alocação aleatória	Amostra	Cego	Métodos	Medidas	Análise estatística	Análise de regressão	Resultado
Adams e cols., 2008 ⁷	+	-	68 ♂ treinados, 57±6 anos	+	+	+	+	-	6/8
Bonsignore e cols., 2010 ⁹	+	-	Maratona (n=9,44±12 anos); Corrida de 1.500 m (n=8,43 ±11 anos)	+	+	+	+	+	7/8
Cubbon e cols., 2010 ²⁶	+	-	15 europeus sedentários, 28±1 ano; 15 sul-asiáticos sedentários, 30±1 ano	+	+	+	+	+	7/8
Goussetis e cols., 2009 ¹⁹	+	-	10 ♂ treinados, 43±1 ano; 10 ♂ sedentários, 42±10 anos	-	+	+	+	-	5/8
Jenkins e cols., 2009 ¹⁷	+	-	8 ♂ treinados, 25±4 anos; 8 ♂ ativos, 25±3 anos	+	+	+	+	-	6/8
Laufs e cols., 2005 ²⁷	+	+	25 ♂ treinados, 28±7 anos	+	+	+	+	-	7/8
Lockard e cols., 2010 ¹⁸	+	-	12 ♂ treinados, 62±2 anos; 11 ♂ ativos, 65±2 anos	-	+	+	+	-	5/8
Möbius-Winkler e cols., 2009 ²²	+	-	18 ♂ treinados, 32±2 anos	-	+	+	+	+	6/8
Thijssen e cols., 2006 ²¹	+	-	8 idosos sedentários (67-76 anos); 8 jovens sedentários (19-28 anos); 8 jovens treinados (18-28 anos)	-	+	+	+	+	6/8
Thorell e cols., 2009 ²⁵	+	-	11 indivíduos treinados (9 ♀ e 2 ♂), 31±7 anos	-	+	+	+	-	5/8
Van Craenenbroeck e cols., 2008 ²³	+	-	11 indivíduos ativos, 24±1 ano; 14 indivíduos ativos, 36±9 anos	-	+	+	+	-	5/8
Yang e cols., 2007 ²⁴	+	-	16 ♂ sedentários, 25±3 anos	+	+	+	+	+	7/8

(+) – aplicado pelo estudo; (-) – não aplicado pelo estudo.

Extração dos dados

Foram extraídos os seguintes dados de cada publicação: o nome do primeiro autor e o ano de publicação; os dados da população/demografia/tamanho da amostra; o momento de obtenção da amostra de sangue; as variáveis estudadas e o método pelo qual foram analisadas; o protocolo, a intensidade e o volume do exercício; e os resultados do estudo, com a correlação entre intervenção e desfecho.

Características dos participantes

O nível de treinamento dos participantes variou desde indivíduos denominados como não ativos ou sedentários^{17,18} até atletas que terminaram uma corrida de 246 km em até 36 horas¹⁹. Por essa razão, na presente revisão sistemática foi elaborada uma classificação baseada no volume de treinamento dos participantes de todos os estudos a fim de padronizar e qualificar os indivíduos em somente três níveis de condição física: Grupo sedentário, participantes cujo volume de treinamento aeróbio era inferior ou igual a uma vez por semana, com sessões de 20 minutos cada; Grupo ativo, praticantes de exercício aeróbio duas a três vezes por semana, com sessões de 20 minutos cada; Grupo treinado, participantes cujo volume de treinamento aeróbio era superior ou igual a quatro vezes por semana, com sessões de 30 minutos cada.

Características do exercício

A resposta das CPE ao exercício pode variar de acordo com o tipo de protocolo utilizado^{7,8,20}. Por isso, foram extraídos de cada estudo os dados referentes a intensidade, volume, duração e frequência de exercício físico utilizado, informações sobre valores percentuais da frequência cardíaca máxima, do consumo de oxigênio (VO_2) máximo ou do limiar anaeróbio dos participantes, bem como a descrição dos autores sobre o protocolo de exercício utilizado, possibilitando a classificação dos exercícios em três categorias: 1. Exercício de longa/ultralonga duração (meia-maratona, maratona ou ultramaratona); 2. Exercício de intensidade máxima, normalmente de caráter progressivo atingindo o máximo do esforço e/ou VO_2 máximo em torno de 5 a 20 minutos. São exemplos típicos o teste ergométrico convencional ou o teste cardiopulmonar de exercício (TCPE); e 3. Exercício de intensidade submáxima, normalmente utilizando como referência o percentual do limiar anaeróbio e/ou VO_2 máximo e com duração máxima de uma hora. No presente estudo, a intensidade do exercício variou entre 80% e 100% do limiar anaeróbio ou superior a 75% do VO_2 máximo.

Resultados

Os 12 estudos incluídos foram classificados como de alta qualidade. Desses, sete eram do tipo transversal; quatro, do tipo longitudinal; e um, com ambos os delineamentos. Em todos os estudos incluídos, os procedimentos metodológicos adotados no dimensionamento e na seleção da amostra, as mensurações das variáveis e os aspectos éticos foram suficientemente descritos. A composição das amostras (total de 286 participantes) variou quanto à faixa

etária, de 18 a 80 anos, e à condição física, de sedentários a treinados (Tabela 1).

A maioria dos estudos relatou efeitos significativos do exercício de diferentes características sobre a mobilização de CPE para o sangue periférico. No entanto, o volume de treinamento ou condição física do participante não influenciou o número de CPE no momento pré-exercício^{17,18,21}. Além disso, após uma sessão única de exercício submáximo, o número de CPE aumentou na circulação de participantes com maior volume de treinamento¹⁷, sugerindo a necessidade de um estímulo agudo perturbador no organismo para a mobilização das células progenitoras endoteliais.

Nas tabelas 2a-2c são apresentadas informações específicas sobre os estudos incluídos e ordenados como: 1. Exercício de longa/ultralonga duração (n = 4 estudos, tab. 2a); 2. Exercício de intensidade máxima (n = 4 estudos, tab. 2b); 3. Exercício de intensidade submáxima (n = 5 estudos, tab. 2c).

Exercício de longa/ultralonga duração

O aumento no número de células CD34+/KDR+ ou de UFC-CE após um exercício de longa/ultralonga duração (maratona/corrida de ultradistância) foi observado em três dos quatro estudos avaliados (tab. 2a). Nos estudos analisados, ocorreu elevação dos marcadores inflamatórios após o exercício, com destaque para a interleucina-6^{8,19,22}.

Em indivíduos treinados, o número de células CD34+/KDR+ aumentou, aproximadamente, duas vezes ao final de uma maratona ($P < 0,005$), enquanto o número de Células Angiogênicas Circulantes (CAC) aumentou, aproximadamente, três vezes ($8,5 \pm 1,9$ vs. $30,2 \pm 4,6$ células/ 1×10^6 mononucleares; $p < 0,0001$), com retorno aos níveis basais na manhã do dia seguinte⁸ ($10,9 \pm 1,8$ células/ 1×10^6 mononucleares). Também em homens treinados, o número de UFC-CE aumentou em torno de 11 vezes ($44,5 \pm 2,5$ vs. $494,5 \pm 27,9/\text{mL}$) após o término de uma corrida de ultradistância (246 km) em até 36 horas, mantendo os níveis elevados até 48 horas ($428,5 \pm 31,5/\text{mL}$; $p < 0,0001$) após o término da corrida¹⁹. Por sua vez, ainda em corredores treinados, o número de células CD34+/VEGFR2+ não se alterou após uma maratona⁷ ($117,0 \pm 8,0$ vs. $128,0 \pm 9,0$ células/ mL ; $p = 0,33$). Uma sessão de exercício em cicloergômetro a 70% do limiar anaeróbio revelou aumento de 5,5 vezes para as células CD34+/KDR+ ($p < 0,001$) e de 3,5 vezes para as células CD133+/KDR+ a partir de 210 minutos de exercício ($p < 0,001$) de forma tempo dependente, com retorno aos níveis basais após 24 horas²². Os níveis de VEGF-C aumentaram no dia seguinte a uma maratona e foram maiores do que no exercício máximo ($p < 0,05$)⁸. Após 10 minutos de exercício em cicloergômetro²², os níveis plasmáticos de VEGF mostraram aumento máximo de 1,9 vez ($79,8 \pm 15,4$ pg/ mL vs. $132,6 \pm 32,1$ pg/ mL ; $p < 0,05$), apresentando correlação significativa com o número de células CD133+/KDR+ ($r = 0,67$; $p = 0,0045$)²². Entretanto, Adams e cols.⁷ mostraram diminuição dos níveis plasmáticos de VEGF após a maratona ($48,9 \pm 8,0$ vs. $34,0 \pm 7,5$ pg/ mL ; $p < 0,05$), porém sem correlação com o número de células CD34+/VEGFR2+.

Artigo de Revisão

Tabela 2a – Resultados de estudos que utilizaram protocolo de exercício de longa/ultralonga duração

Estudo	Coleta de sangue	Identificação das CPE	Protocolo de exercício	Variáveis/ Métodos	Resultados	Correlação (intervenção/ desfecho)
Adams e cols., 2008 ⁷	Antes e imediatamente após a maratona	Citometria: CD34+/ VEGFR2+	Maratona de Dusseldorf 2006, duração $\approx$ 4h	VEGF e EGF plasmáticos/ ELISA	Sem alteração no nº de células CD34+/VEGFR2+ e $\downarrow$ VEGF após a maratona	Sem correlação
Bonsignore e cols., 2010 ⁸	2-3 dias antes, imediatamente após e 18-20h após a maratona	Citometria: CD34+/KDR+; Cultura: CAC	Maratona Internacional de Palermo 2005, duração $\approx$ 3h30min	VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D plasmáticos/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ ($\approx$ 2x), $\uparrow$ CAC (3x) imediatamente após e $\uparrow$ VEGF-C (18-20h após)	–
Goussetis e cols., 2009 ¹⁹	Antes, imediatamente após e 48h após a corrida	Cultura: UFC-CE	Corrida de ultradistância de 246 km (Spartathlon), duração $\approx$ 32h8min	–	$\uparrow$ UFC-CE (11x) imediatamente após e 48h após a corrida	–
Möbius-Winkler e cols., 2009 ²²	Antes, durante (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240min) e após (30, 60, 120, 1.440min) o exercício	Citometria: CD34+/KDR+ e CD133+/KDR+	Teste em cicloergômetro a 70% do LA durante 4h	VEGF plasmático/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ (5,5x), $\uparrow$ CD133+/KDR+ (3,5x) e $\uparrow$ VEGF após 10min	Correlação entre células CD133+/KDR+ e VEGF ($r = 0,67$)

CPE – células progenitoras endoteliais; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciação 34; VEGFR2 – em inglês, receptor 2 do fator de crescimento endotélio vascular; VEGF – em inglês, fator de crescimento endotélio vascular (tipos A, C, D); EGF – em inglês, fator de crescimento epidermal; ELISA – em inglês, ensaio de imunabsorção; KDR – em inglês, domínio de inserção da quinase do receptor do fator de crescimento endotélio vascular; CAC – em inglês, células angiogênicas circulantes; UFC-CE – unidade formadora de colônia de célula endotelial; CD 133 – cluster de diferenciação 133; LA – limiar anaeróbico.

Tabela 2b – Resultados de estudos que utilizaram protocolo de exercício de intensidade máxima

Estudo	Coleta de sangue	Identificação das CPE	Protocolo de exercício	Variáveis/ Métodos	Resultados	Correlação (intervenção/ desfecho)
Bonsignore e cols., 2010 ⁸	Antes e após a corrida (3-5min)	Citometria: CD34+/KDR+ Cultura: CAC	Corrida de 1.500m (duração: 5min $\pm$ 35s); frequência cardíaca máxima 178 $\pm$ 6 bpm	VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D plasmáticos/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ ($\approx$ 3x), $\uparrow$ CAC e $\uparrow$ VEGF-C	–
Thijssen e cols., 2006 ²¹	Antes e 10min após exercício	Citometria: CD45/CD34+/ VEGFR2+	TCPE máximo em cicloergômetro – Jovens: 20W/min e Idosos: 10W/min	VEGF plasmático/ ELISA	Sem alteração no nº de células CD34+/VEGFR2+ entre jovens e idosos (treinados ou sedentários); sem alteração VEGF em jovens e idosos (treinados ou sedentários)	Sem correlação
Van Craenenbroeck e cols., 2008 ²³	Antes e 10min após o pico do exercício	Citometria: CD34+/KDR+; Cultura: UFC-CE	TCPE máximo em cicloergômetro a 40W e incremento de 20W/min	Nitrato-Nitrito plasmáticos/ Colorimetria; VEGF/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+ após exercício em ambos os grupos	Sem correlação
Yang e cols., 2007 ²⁴	Antes e 30min após exercício	Citometria: CD34+/KDR+; Cultura: Lectina UEA-1+FITC/ Dil-acLDL+	TCPE máximo em esteira (protocolo de Bruce modificado, duração de 9,6 $\pm$ 2,2min e 10,2 MET)	Nitrato-Nitrito plasmáticos e em cultura/ Colorimetria; VEGF/ ELISA	$\uparrow$ CD34+/KDR+, $\uparrow$ Lectina UEA-1-FITC+/Dil-acLDL+ e $\uparrow$ nitrato-nitrito plasmáticos após exercício	Correlação positiva entre CPE e níveis de nitrato-nitrito plasmáticos ($r = 0,70$)

CPE – células progenitoras endoteliais; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciação 34; VEGFR2 – em inglês, receptor 2 do fator de crescimento endotélio vascular; VEGF – em inglês, fator de crescimento endotélio vascular (tipos A, C, D); ELISA – em inglês, ensaio de imunabsorção; KDR – em inglês, domínio de inserção da quinase do receptor do fator de crescimento endotélio vascular; CAC – em inglês, células angiogênicas circulantes; UFC-CE – unidade formadora de colônia de célula endotelial; UEA-1-FITC – em inglês, aglutinina Ulex Europeus tipo 1 conjugada com isotiocianato de fluoresceína; Dil-acLDL – em inglês, lipoproteína de baixa densidade acetilada marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina; TCPE – Teste cardiopulmonar de esforço; MET – em inglês, equivalente metabólico; W – watts; bpm – batimentos por minuto; CD45 – cluster de diferenciação 45.

Tabela 2c – Resultados de estudos que utilizaram protocolo de exercício de intensidade submáxima com duração menor que 1h

Estudo	Coleta de sangue	Identificação das CPE	Protocolo de exercício	Variáveis/ Métodos	Resultados	Correlação (intervenção/ desfecho)
Cubbon e cols., 2010 ²⁶	Antes e 20min após exercício	Citometria: CD34+/KDR+; CD133+/CD34+/KDR+	Teste em cicloergômetro a 80% do LA durante 30min	Bloqueio da eNOS (L-NMMA)	↑CD34+/KDR+, ↑CD133/CD34+/KDR+ após exercício; ↓CD34+/KDR+; ↓CD133+/CD34+/KDR+ após infusão de L-NMMA	–
Jenkins e cols., 2009 ¹⁷	Antes e 30min após exercício	Cultura: UFC-CE	Teste em esteira a 75-80% do VO ₂ máx. durante 30min	NO intracel/ corante fluorescente; Estresse oxidativo/ PCR-RT	↑UFC-CE no grupo treinado após exercício; ↓NADPH-ox (gp91 ^{phox}) em ambos os grupos após exercício; ↑NOi e ↓NADPH-ox (p47 ^{phox}) no grupo ativo, após exercício	–
Laufs e cols., 2005 ²⁷	Antes e 10min, 30min, 2h, 6h e 24h após o exercício	Citometria: CD34+/KDR+; Cultura: UFC-CE	Corridas: 1) ↑ intensidade: 30min, 100% do LA; 2) Moderada intensidade: 30min, 80% do LA; 3) Curta e moderada intensidade: 10min, 80% do LA	VEGF plasmático/ ELISA	↑CD34+/VEGFR2+ 30min após corrida de alta e moderada intensidades; ↑UFC-CE 30min após corrida de alta intensidade	Sem correlação
Lockard e cols., 2010 ¹⁸	Antes e 30min após exercício	Citometria: CD34+/VEGFR2+; Cultura: UFC-CE	Teste em esteira (75% ± 5% do VO ₂ máx.) durante 30min	–	Sem alteração nº de células CD34+/VEGFR2+ ou UFC-CE antes e após exercício	–
Thorell e cols., 2009 ²⁵	Antes, 1h, 24h e 48h após exercício	Cultura: colônias de célula endotelial de crescimento tardio	Spinning em bicicleta a 80% da frequência cardíaca máxima durante 1h	VEGF plasmático/ ELISA	↑nº de colônias tardias (2x) 1h após exercício	Correlação entre nº de colônias e os níveis de VEGF (r = 0,903)

CPE – células progenitoras endoteliais; (+) – positivo; CD34 – cluster de diferenciação 34; VEGFR2 – em inglês, receptor 2 do fator de crescimento endotélio vascular; VEGF – em inglês, fator de crescimento endotélio vascular (tipos A, C, D); ELISA – em inglês, ensaio de imunabsorbância; KDR – em inglês, domínio de inserção da quinase do receptor do fator de crescimento endotélio vascular; UFC-CE – unidade formadora de colônia de célula endotelial; CD 133 – cluster de diferenciação 133; LA – limiar anaeróbico; eNOS – em inglês óxido nítrico sintase endotelial; L-NMMA – N5-[imino(methylamino)methyl]-L-ornithine citrate; NO intracel – óxido nítrico intracelular; NADPH oxidase – em inglês, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; PCR-RT – em inglês, reação em cadeia da polimerase em tempo real; VO₂ máx. – consumo máximo de oxigênio.

Exercício de intensidade máxima

Quatro estudos avaliaram o efeito de uma sessão única de exercício máximo no número de CPE^{8,21,23,24} (tab. 2b).

No estudo de Yang e cols.²⁴ houve aumento significativo de células CD34+/KDR+ (p < 0,05) e de células lectina UEA1-FITC+/Dil-acLDL+ (p < 0,05) nos 30 minutos após a realização de um TCPE em esteira. Em indivíduos treinados, as células CD34+/KDR+ aumentaram três vezes (p < 0,01) após o término de uma corrida de 1.500 m⁸. Os níveis de CAC também aumentaram significativamente após a corrida de 1.500 m⁸ (p < 0,005). Resultados semelhantes foram mostrados por Van Craenenbroeck e cols.²³, que revelaram aumento de 76% das células CD34+/KDR+ em jovens com idades de 24 ± 1 anos (15,4 ± 10,7 vs. 27,2 ± 13,7 células/mL; p = 0,01) e aumento de 69% em adultos

com idades de 36 ± 9 anos (30,9 ± 14,6 vs. 52,5 ± 42,6 células/mL; p = 0,03); entretanto, não ocorreu mudança significativa no percentual de UFC-CE (11,9 ± 10,9 vs. 9,0 ± 8,3 UFC-CE; p = 0,2). Somente no estudo de Thijssen e cols.²¹ não houve mudança no número de CPE após TCPE entre jovens e idosos treinados e sedentários (p > 0,05).

Na maioria dos estudos não houve mudança significativa nos níveis plasmáticos de VEGF após sessão única de exercício máximo^{21,23,24}, porém no estudo de Bonsignore e cols.⁸, os níveis plasmáticos de VEGF-C (7,3 ± 1,8 vs. 8,8 ± 1,7 pg/mL; p < 0,001) aumentaram após uma corrida de 1.500 m (tab. 2b).

O aumento dos níveis plasmáticos de Óxido Nítrico (NO) foi observado 30 minutos após a realização de um TCPE em esteira pelo estudo de Yang e cols.²⁴ (p < 0,05). Além

Artigo de Revisão

disso, a análise por regressão linear revelou correlação positiva ($r = 0,70$; $P < 0,05$) entre o aumento de CPE e os níveis de NO^{24} .

Exercício de intensidade submáxima com duração menor que uma hora

Dos cinco trabalhos^{17,18,25-27} que avaliaram o efeito de uma sessão de exercício submáximo sobre o número de CPE ou de UFC-CE (tab. 2c), três estudos^{17,18,27} utilizaram um protocolo baseado em uma corrida em pista de 400 m ou em esteira com 30 minutos de duração e intensidade de exercício entre 68% e 82% do VO_2 máximo, aproximadamente.

Apesar de Lockard e cols.¹⁸ não terem encontrado alteração no número de células $\text{CD34+}/\text{VEGFR2+}$ ($p > 0,05$) e nas UFC-CE ($p > 0,05$) após 30 minutos de exercício com intensidade de $75 \pm 5\%$ do VO_2 máximo, a maioria dos estudos não parece corroborar esse achado. Jenkins e cols.¹⁷ mostraram que, em homens treinados, as UFC-CE aumentaram significativamente após 30 minutos de exercício submáximo ($p = 0,02$). O exercício moderado ou intenso (80% e 100% do limiar anaeróbico, respectivamente) de mesma duração aumentou o número de CPE circulantes ($\text{CD34+}/\text{VEGFR2+}$ e lectina UEA 1-FITC+/Dil-acLDL+) com pico de resposta entre 10 e 30 minutos após o término da sessão do exercício ($p < 0,01$). As UFC-CE também aumentaram após 30 minutos de corrida de alta intensidade²⁷ ($p < 0,05$). Além disso, uma sessão de exercício em cicloergômetro, com duração de 30 minutos a 80% do limiar anaeróbico²⁶, provocou o aumento do número de células $\text{CD34+}/\text{KDR+}$ e $\text{CD133+}/\text{CD34+}/\text{KDR+}$ em indivíduos caucasianos europeus ($85,4 \pm 1,3\%$ e $73,9 \pm 9,1\%$; respectivamente), bem como em asiáticos ($53,2 \pm 6,9\%$ e $48,3 \pm 8,8\%$; respectivamente) 20 minutos após o término da sessão. Em outro estudo²⁵, uma sessão única de *spinning*, com duração média de $44,3 \pm 3,4$ minutos e uma frequência cardíaca que variou entre 77%-95% da frequência cardíaca máxima, foi capaz de dobrar o número de colônias de célula endotelial de crescimento tardio, outro tipo de colônias de CPE. Além disso, os níveis de VEGF apresentaram correlação significativa com o número de colônias de célula endotelial de crescimento tardio ($r = 0,903$)²⁵. Os efeitos da sessão única de *spinning* diminuíram ao longo do tempo com retorno aos níveis basais após 48 horas.

Em homens treinados, o exercício reduziu, agudamente, os níveis de RNA mensageiro (RNAm) da NADPH oxidase ($\text{gp91}^{\text{phox}}$) em UFC-CE¹⁷ ($p = 0,02$). Em homens ativos, houve aumento da produção de NO intracelular ($p = 0,004$) e redução da expressão da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase ($P < 0,05$), mas sem diferença para outros marcadores de estresse oxidativo¹⁷ ($p > 0,05$). A infusão de L-NMMA, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), reduziu o 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%; $p < 0,001$). Além disso, uma análise por regressão linear mostrou uma correlação positiva entre a vasodilatação mediada pelo fluxo e as células $\text{CD34+}/\text{KDR+}$ ($r = 0,41$; $p = 0,02$) e $\text{CD133+}/\text{CD34+}/\text{KDR+}$ ($r = 0,39$; $p < 0,04$)²⁶.

Discussão

Recentes trabalhos^{15,24} demonstraram que a melhora da função endotelial induzida pelo exercício se deve, em parte, pela mobilização de CPE para a circulação periférica, onde atuam nos processos de neovascularização e de reparo endotelial¹⁵. Por essa razão, o exercício físico é um importante método para promover a saúde do sistema cardiovascular, tanto em indivíduos saudáveis²⁸ quanto em indivíduos com fatores de risco cardiovascular^{29,30}.

Exercício de longa/ultralonga duração

As maratonas, meia-maratonas e corridas de ultradistância são modelos de inflamação induzida que estimulam o aumento dos níveis circulantes de mediadores pró e anti-inflamatórios³¹, promovendo a liberação, a migração e a diferenciação das células-tronco da medula óssea³². Esse tipo de exercício também aumenta os níveis plasmáticos de citocinas e de marcadores de ativação endotelial, oferecendo uma oportunidade de se avaliar os mecanismos fisiológicos relacionados ao reparo vascular, antes que um dano tecidual irreversível tenha ocorrido³³.

Os resultados mostraram que os exercícios de longa/ultralonga duração aumentam significativamente a concentração de células progenitoras, especialmente as endoteliais, e de leucócitos^{8,19,22}. Os níveis plasmáticos de interleucina-6 mostraram-se elevados durante e após exercício de longa/ultralonga duração, evidenciando o seu caráter inflamatório^{8,19}.

Ainda nesse contexto, os maiores níveis plasmáticos de VEGF foram verificados após esse tipo de exercício. Acredita-se que os níveis elevados desse fator estejam associados à presença de hipóxia nos tecidos nessas condições, o que favoreceria o estímulo de mobilização das CPE e o reparo endotelial. Portanto, esse aumento de VEGF parece demonstrar um mecanismo de adaptação fisiológica ao exercício de longa/ultralonga duração, e sugere que haja uma correlação positiva entre a intensidade do exercício e a liberação de fatores de crescimento⁸.

A duração do exercício, por sua vez, parece estar associada à permanência dos efeitos do mesmo sobre as CPE. Protocolos de exercício com aspecto extremo¹⁹ apresentaram repostas mais duradouras (até 48 horas após o término da sessão de exercício) do que maratonas (até 24 horas após o término da sessão de exercício)⁸.

Finalmente, acredita-se que a diferença de idade entre as populações dos estudos analisados possa explicar os resultados contraditórios obtidos, uma vez que a idade influencia o número e a funcionalidade das CPE³⁴.

Exercício de intensidade máxima

Os exercícios de intensidade máxima são caracterizados por um grande aumento no estresse de cisalhamento vascular³⁵, o qual pode ser considerado um efeito subagudo do exercício físico²⁸. A maioria dos resultados mostrou que uma única sessão de exercício máximo parece aumentar o número de CPE^{8,23,24}, os níveis de NO plasmático²⁴, bem como os níveis plasmáticos do VEGF-C⁸. Entretanto, uma correlação positiva foi encontrada

apenas entre o aumento de CPE e os níveis de NO²⁴. Além disso, a magnitude do incremento utilizado nos protocolos de exercícios parece contribuir para resultados mais significativos²⁴.

Alguns estudos que utilizaram condições semelhantes de exercício e perfil populacional^{21,23,24} mostraram resultados muito diferentes para o número de CPE na condição basal. Ao menos parte dessa heterogeneidade decorre da ausência de um protocolo padronizado para a quantificação, identificação e análise das CPE. Por essa razão, torna-se difícil comparar e consolidar os resultados dos diferentes estudos, sendo esse o maior desafio metodológico no avanço do conhecimento nessa área.

Exercício de intensidade submáxima com duração menor que uma hora

Sessões de exercício de intensidade submáxima correspondem a sessões sucessivas que compõem o treinamento; portanto, o estudo das respostas fisiológicas a esse tipo de exercício pode contribuir para a compreensão do processo global de adaptação endotelial ao treinamento físico³⁶.

Em jovens, o exercício de intensidade submáxima promoveu aumento significativo das UFC-CE, das CPE ou de colônias de célula endotelial de crescimento tardio. Além disso, verificou-se que os níveis de CPE circulantes não variaram em resposta a um exercício de maior intensidade e mesma duração²⁷. Entretanto, um protocolo fatigante, que combina intensidade submáxima e maior duração (cerca de uma hora de duração), documentou um efeito mais duradouro do exercício sobre as CPE, sendo observado até 48 horas após o término da sessão. Além disso, esse protocolo se correlacionou fortemente com os níveis plasmáticos de VEGF ($r = 0,903$)²⁵.

Em razão da grande variabilidade interindividual encontrada, não foram verificadas diferenças significativas no número de CPE ou de UFC-CE após exercício, em atletas idosos¹⁸.

Quanto à influência da condição física sobre as CPE, os estudos são controversos. Jovens treinados¹⁷ mostraram aumento significativo de UFC-CE. No entanto, o aumento de células CD34+/KDR+ ou CD34+/VEGFR2+ foi observado tanto em indivíduos sedentários²⁶ quanto em indivíduos treinados²⁷.

O principal mecanismo envolvido na mobilização das CPE após a realização de exercício submáximo parece estar associado à biodisponibilidade de NO. Em homens ativos, o exercício promoveu uma diminuição da expressão da NADPH oxidase, importante fator causador de estresse oxidativo no sistema cardiovascular e um aumento dos níveis de NO intracelular nas UFC-CE¹⁷. Em indivíduos sedentários, o exercício promoveu redução significativa da mobilização de células CD34+/VEGFR2+ após o bloqueio da eNOS por infusão com L-NMMA²⁶. Esses dados sugerem que a NADPH oxidase pode ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da produção de NO intracelular nas UFC-CE¹⁷.

Até o momento, alguns estudos^{9,26,35} têm demonstrado um dos possíveis mecanismos pelo qual a produção de NO induzida agudamente pelo exercício contribui para o aumento de CPE. Nesses estudos, os autores propõem que o exercício promova aumento do estresse de cisalhamento no endotélio, elevando os níveis de cálcio intracelular e,

consequentemente, ativando a eNOS. A ativação dessa enzima, por sua vez, promove o aumento do NO, a ativação da metaloproteinase 9 e a liberação do ligante Kit solúvel, sendo esse crucial para a mobilização de CPE da medula óssea para a circulação periférica²⁶.

Apesar do fato de que um tecido isquêmico é por definição um tecido patológico e, por essa razão, está ausente em indivíduos saudáveis, os exercícios de longa e ultralonga duração são modelos de isquemia fisiológica, pois provocam mudanças no metabolismo glicolítico anaeróbico, além de gerar estresse oxidativo²³. As espécies reativas do oxigênio são essenciais para a hipóxia³⁷. O fator induzido por hipóxia-1 é ativado após sessões únicas de exercício³⁸, estimulando a expressão gênica de importantes moléculas mobilizadoras de CPE, como o VEGF¹⁰. Na presença de VEGF ocorre a ativação da eNOS, o aumento do NO e, assim, a mobilização de CPE da medula óssea²⁶. Além dessas condições, o NO também é a molécula-chave nos exercícios de menor duração e o aumento na sua biodisponibilidade parece depender, especialmente, de dois mecanismos: no primeiro, a ativação da proteína quinase 3 mediada pelo aumento do estresse de cisalhamento ativa a eNOS e essa aumenta a produção de NO³⁹. No segundo mecanismo, o exercício reduz a expressão de NADPH, aumentando a biodisponibilidade de NO com consequente mobilização de CPE da medula óssea. Pelo exposto, podemos sugerir que as sessões únicas de exercício de intensidade e durações diferentes mobilizam as CPE para o sangue periférico por mecanismos diferentes entretanto, o NO parece ser uma molécula comum em ambas as vias de mobilização.

Conclusão

A mobilização de células progenitoras endoteliais foi mais acentuada no exercício de longa/ultralonga duração e parece estar associada aos níveis plasmáticos de fator de crescimento endotélio vascular. Enquanto os exercícios máximo e submáximo com até uma hora de duração provocam aumento, em menor magnitude, do número de células progenitoras endoteliais na circulação, porém o mecanismo principal de mobilização parece ser a biodisponibilidade de óxido nítrico.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro das seguintes instituições: Capes, Faperj, CNPq, Finep e Labs D'Or.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Capes, Faperj, CNPq, Finep e Labs D'Or.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Natália Galito Rocha pela Universidade Federal Fluminense.

Referências

- 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.
- 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.
- 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.
- Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(7):741-52.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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].
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45(3):321-5.
- 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.
- Hoetzer GL, Van Guilder GP, Immiger 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.