

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências

Cardiovasculares

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E RESISTIDO: EFEITO SOBRE CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES COMO REPRESENTATIVO
DE FUNÇÃO ENDOTELIAL EM PACIENTES COM DIABETES TIPO 1**

Gustavo Waclawovsky

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO 2013.

FACULDADE DE MEDICINA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências

Cardiovasculares

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E RESISTIDO: EFEITOS SOBRE AS
CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES COMO
REPRESENTATIVO DE FUNÇÃO ENDOTELIAL EM PACIENTES COM
DIABETES TIPO 1.**

Aluno: Gustavo Waclawovsky

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz D' Agord Schaan

*Dissertação de mestrado apresentada
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares, à Universidade
Federal do Rio Grande do Sul,
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares.*

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Waclawovsky, Gustavo Waclawovsky
EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO E RESISTIDO: EFEITO
SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES
COMO REPRESENTATIVO DE FUNÇÃO ENDOTELIAL EM
PACIENTES COM DIABETES TIPO 1 / Gustavo Waclawovsky
Waclawovsky. -- 2013.
84 f.

Orientador: Beatriz D' Agord Schaan.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Diabetes tipo 1. 2. Exercício físico. 3. Células
progenitoras endoteliais. 4. Efeito agudo. I. D'
Agord Schaan, Beatriz, orient. II. Título.

Dedico todo o esforço deste trabalho

À minha mãe Ana Maria Prates por ter me ensinado valores que transcendem os acadêmicos e, incontestavelmente, me auxiliaram a superar todos os momentos em que as fatalidades do cotidiano foram mais fortes que eu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Franciele Ramos Figueira por proporcionar a oportunidade de trabalhar como voluntário em seu projeto de mestrado iniciando minha inserção no programa de pós-graduação em cardiologia o qual almejava tanto fazer parte.

Agradeço ao meu colega Paulo J. C. Vieira por não medir esforços para me auxiliar e ensinar em protocolos e rotinas de pesquisa as quais inicialmente pareciam impossíveis de realizar.

Agradeço a meu colega Julio Zago que compartilhou grande parte das disciplinas de maneira descontraída fazendo com que prazos para entrega de trabalho, matérias incompreensivas e cansaço físico se tornassem motivos para boas risadas.

Gostaria de deixar um agradecimento especial aos meus grandes amigos(as) Julio Zago, Luís Fernando Deresz, Daniel Umpierre, Gaspar Chiappa, Ângela Maria Vicente Tavares e Lucinara Dadda Dias que ultrapassaram o ambiente de pesquisa para com palavras e gestos me levantar de quedas pessoais as quais sem auxílio acredito não ter sido possível chegar até aqui.

Agradeço a Lucinara Dadda Dias que me ensinou a trabalhar em bancada e calmamente me explicou desde o que é uma pipeta até como ligar um microscópio eletrônico.

Agradeço a Dra Ana Paula Alegretti que em vários momentos abdicou de seu tempo livre para tentar fazer com que eu compreendesse como funcionava a aquisição de células por técnica de citometria de fluxo.

Agradeço as bolsistas de iniciação científica Eliandra S. de Lima, Letícia R. Bimbi, Bruna Beutler e Laiana Schneider que auxiliaram, cada uma com sua tarefa, a conclusão deste trabalho.

Agradeço a nossa querida Sirlei do PPG cardiologia que sempre deu um jeito de resolver os problemas ou ajudar em documentações que apareciam repentinamente.

Agradeço enormemente o acolhimento e paciência da Dra Beatriz D'Agord Schaan a qual acreditou no meu trabalho e me orientou de forma incomparável fazendo com que se tornasse uma grande referência em ética e pesquisa.

Quero agradecer o Dr Daniel Umpierre que na minha primeira visitas ao ainda pequeno LaFiEx me acolheu com tamanha simpatia e indiferença que me fez acreditar que tinha feito a escolha certa. Quero agradecer enormemente as oportunidades dentro e fora do laboratório, bem como, aos ensinamentos e a grande amizade.

Neste momento de felicidade fico entristecido em não poder presenciar a figura do professor Dr Jorge Pinto Ribeiro o qual por indicação da Dr^a Beatriz D'Agord Schaan não hesitou em aceitar me orientar. O professor Dr Jorge Pinto Ribeiro tinha uma incansável maneira de buscar respostas e para isso depositava toda sua confiança em seu grupo de pesquisa o qual envolvia em

grande parte não médicos, categoria que brigava incansavelmente para ter espaço e reconhecimento dentro do programa de pós-graduação. A felicidade em ver uma figura representativa dos dados de apenas dois indivíduos me vem na lembrança juntamente as palavras de motivação que renovavam a vontade, muitas vezes abalada, que sentíamos em dar continuidade a pesquisa. Enfim, não tenho palavras para agradecer todos os ensinamento que o professor Dr Jorge Pinto Ribeiro deixou a mim e a todos que tiveram a oportunidade de conviver com ele. Tenho certeza que seus ensinamentos e palavras vão sempre estar presentes em nossas lembranças para nos direcionar a fazer a coisa certa. Muito obrigado professor.

Quero agradecer minha família, em especial minha mãe Ana Maria Prates, que não mediu esforços para me auxiliar na conclusão desta etapa. Agradeço pela educação que me deste e ensinamentos que transcendem as portas acadêmicas. A virtude da paciência, compreensão e humildade as quais necessitei de maneira contínua ao longo desta trajetória é mérito seu. Agradeço todo amor e dedicação que recebo de você para simplesmente ter a oportunidade de ver o meu sucesso.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| INTRODUÇÃO..... | 10 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1 Função endotelial | 14 |
| 2.2 Efeito da atividade física habitual na vasodilatação dependente do endotélio e no número de células progenitoras endoteliais circulantes. | 20 |
| 2.3 Efeitos agudos do exercício físico aeróbico na vasodilatação dependente do endotélio..... | 22 |
| 2.4 Efeitos crônicos do treinamento aeróbico na vasodilatação dependente do endotélio..... | 24 |
| 2.5 Efeitos agudos do exercício aeróbico no número de células progenitoras endoteliais circulantes. | 26 |
| 2.6 Efeitos crônicos do treinamento aeróbico no número de células progenitoras endoteliais circulantes. | 27 |
| 2.7 Efeitos agudos do exercício físico resistido na vasodilatação dependente do endotélio..... | 30 |
| 2.8 Efeitos crônicos do treinamento resistido na vasodilatação dependente do endotélio..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9 Efeitos do exercício resistido e do treinamento resistido no número de células progenitoras endoteliais circulantes | 35 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |
| OBJETIVOS..... | 50 |
| 3.1 Objetivo geral | 50 |
| 3.2 Objetivos específicos | 50 |
| <i>Original Articles</i>..... | 51 |
| <i>ABSTRACT</i> | 52 |
| <i>INTRODUCTION</i> | 53 |
| <i>RESEARCH DESIGN AND METHODS</i> | 54 |
| <i>RESULTS</i> | 61 |
| <i>DISCUSSION</i> | 64 |
| <i>REFERENCES</i> | 72 |
| <i>TABLES</i> | 78 |
| <i>FIGURES</i> | 79 |
| ANEXO | 84 |
| Anexo 1. Classificação de intensidade para prática de exercício físico aeróbico e resistido | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosina difosfato

CD34: *Cluster of differentiation for hematopoietic stem cells*

CD45: *Cluster of differentiation for leukocyte cells*

CPE: Células progenitoras endoteliais

CXCR4: *C-X-C chemokine receptor type 4*

eNOs: Óxido nítrico sintase endotelial

FC_{Máx}: Frequência cardíaca máxima

FC_{res}: Frequência cardíaca de reserva

FMD: Vasodilatação mediada por fluxo

FvW: Fator de von Willebrand

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica

HbA1c: Hemoglobina glicada

IDF: *International Diabetes Federation*

IMC: Índice de massa corporal

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

NO: Óxido nítrico

1RM: Uma repetição máxima

VE-cadherin: *Vascular endothelial cadherin*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-2 (KDR): receptor for vascular endothelial growth factor

VO_{2pico}: Consumo de oxigênio de pico

VO_{2Máx}: Consumo máximo de oxigênio

INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença autoimune crônica, caracterizada por destruição gradual e específica das células beta pancreáticas produtoras de insulina. O processo inflamatório causador desta destruição pode durar vários anos e resulta em completa destruição destas células, hiperglicemia e dependência de insulina ao longo da vida (1).

A incidência de diabetes tipo 1 vinha estável e relativamente baixa na primeira metade do século 20, mas apresentou claro aumento logo após a metade do século, principalmente em alguns dos países da Europa Central e Oriental (2) (3). A *International Diabetes Federation* (IDF) reportou que em 2011 a população mundial total de crianças com diabetes em faixa etária abaixo de 15 anos foi de 1.900.000; destes, 490.100 apresentavam diabetes tipo 1, sendo diagnosticados 77.800 novos casos por ano, representando um aumento anual de 3% (4).

Complicações em longo prazo do diabetes incluem retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia levando à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés, amputação e neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, no trato gênito-urinário e disfunção sexual (5). O diabetes tipo 1 também determina risco aumentado para doença cardiovascular aterosclerótica (5). Uma maior taxa de mortalidade decorrente de doença arterial coronariana em indivíduos com diabetes tipo 1 é bem descrita na literatura, independente de faixa etária ou gênero (6) (7). Apesar de apresentar reduções no nível de mortalidade ao longo da história, a prevalência

de doença arterial coronária permanece elevada em indivíduos com 20 a 30 anos de diagnóstico (8).

Na patogênese da doença aterosclerótica identifica-se inicialmente uma mudança qualitativa da monocamada de células endoteliais que reveste a superfície interna das artérias quando expostas a estímulos irritativos como hipertensão, dislipidemia, ou mediadores pró-inflamatórios. Tais estímulos induzem as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, que recrutam leucócitos para sua superfície. Paralelamente ocorrem alterações na permeabilidade do endotélio e na composição da matriz extracelular sob o endotélio, promovendo a entrada e retenção de colesterol com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (9). Componentes bioquimicamente modificados destas partículas podem induzir a adesão dos leucócitos, e partículas intactas modificadas sofrem endocitose por macrófagos, levando ao acúmulo intracelular do colesterol. Na progressão, mediadores direcionam os leucócitos para camada íntima, a mais interna da artéria, onde os monócitos, os mais numerosos glóbulos brancos em placa, diferenciam-se em macrófagos que engolfam partículas de lipoproteínas e se tornam células espumosas (10).

O recrutamento de células musculares lisas da camada média para a camada íntima também está envolvido na formação da placa aterosclerótica (ateroma). Após a migração da camada média para íntima, as células musculares lisas proliferam em resposta a mediadores, tais como fatores de crescimento derivados de plaquetas, e produzem moléculas da matriz extracelular, incluindo colágeno intersticial e elastina, para formar uma capa fibrosa que cobre a placa. Esta capa geralmente recobre células espumosas e células musculares lisas mortas que liberam lipídeos que se acumulam no

centro da placa. A liberação ineficaz das células mortas pode promover o acúmulo de detritos celulares e lipídios extracelulares, denotando um núcleo central necrótico rico em lipídeos (11).

A placa aterosclerótica pode determinar manifestações clínicas, produzindo limitação de fluxo sanguíneo se causar estenoses, levando à isquemia do tecido, ou por formação de trombos que podem interromper o fluxo de sangue no local ou ainda se soltar e se alojar em artérias distais para provocar doença trombótica aguda vascular, incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e morte súbita (9).

A disfunção endotelial precede, e é importante na patogênese da aterosclerose (12) (13). Técnica não invasiva como ultrassonografia demonstra que a resposta vasodilatadora braquial para hiperemia reativa é intimamente relacionada com a resposta vasodilatadora coronária à acetilcolina (13). Estes resultados demonstram a utilidade de métodos não invasivos para avaliar a função endotelial antes e durante todas as fases de desenvolvimento e tratamento da aterosclerose, evidenciando que a disfunção endotelial é um processo generalizado e não está necessariamente confinada a leitos vasculares com aterosclerose clinicamente manifesta.

A prática regular de exercício físico possui impacto relevante na prevenção da disfunção endotelial em patologias como hipertensão (14), insuficiência cardíaca (15) e diabetes mellitus (16). Além dos efeitos promovidos pelo exercício físico regular, existem evidências de que uma única sessão de exercício físico pode proporcionar melhorias na função endotelial na maioria destas populações (17) (18). No entanto, temos uma lacuna

considerável a ser preenchida em relação à resposta da função endotelial ao exercício físico em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

Portanto, decidimos revisar os aspectos envolvidos na recuperação do endotélio, contextualizando o leitor sobre as respostas crônicas e agudas do exercício físico na função endotelial. Por fim, considerando a carência de informações sobre as respostas do exercício físico em pacientes com diabetes mellitus tipo 1, conduzimos um estudo original que apresenta os efeitos agudos de uma única sessão de exercício aeróbico e uma única sessão de exercício resistido sobre os níveis de células progenitoras endoteliais (CPE) circulantes e hiperemia reativa avaliada por pletismografia no diabetes tipo 1.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Função endotelial

A parede arterial compõe-se de conjunto de três camadas: íntima, média e adventícia (19). É na íntima que encontramos o endotélio, uma única camada de células com importante função na modulação da angiogênese vascular, respostas inflamatórias, homeostase, bem como tônus vascular e permeabilidade (20). Esta função de proteção vascular é particularmente atribuída à óxido nítrico sintase endotelial (eNOs), uma enzima responsável pela produção do óxido nítrico (NO). O NO dependente do endotélio pode ser estimulado por diferentes fatores fisiológicos, entre eles, forças físicas, hormônios circulantes (catecolaminas, vasopressina, aldosterona), produtos plaquetários de serotonina (adenosina difosfato - ADP), autacóides (histamina, bradicinina) e prostaglandinas (21). A capacidade de dilatar todos os tipos de vasos sanguíneos, estimulando a guanilato ciclase solúvel e aumentando a guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nas células do músculo liso é a principal contribuição do NO (22).

A diminuição da produção de NO, biodisponibilidade local reduzida, e/ou resposta vasomotora insuficiente caracterizam a disfunção endotelial. Sua avaliação pode ser feita dosando marcadores como moléculas de adesão, citocinas e prostanóides no sangue ou em avaliação funcional pela medição da dilatação dependente do endotélio *in vivo*, quer em resposta a agonistas ou a mudanças no fluxo do antebraço, coronárias, ou circulação periférica (23). O

método de avaliação da dilatação mediada pelo fluxo (*flow-mediated dilatation - FMD*) por ultrasonografia mostrou resultados capazes de prever eventos cardiovasculares (24), e embora seja um método indireto para avaliar a função endotelial, é não invasivo e, portanto, tem sido amplamente utilizado (25) (26). Outro método não invasivo capaz de avaliar a função endotelial é a pletismografia de oclusão venosa (*venous occlusion plethysmography*), técnica utilizada para verificação da resposta vasomotora de membros superiores e inferiores (17) que apresenta boa correlação com o método realizado por ultrasonografia (27) (28). A verificação do fluxo de sangue dos membros por pletismografia de oclusão venosa baseia-se na avaliação das mudanças no volume do membro avaliado em uma correspondente mudança na circunferência captadas por um sensor elástico (*strain gauge*) localizado na maior circunferência do antebraço ou da perna (29). Por ser uma técnica que avalia mudanças na circunferência do membro, a pletismografia de oclusão venosa analisa não somente a resposta endotelial, mas também a microvascular (30). Assim, o termo hiperemia reativa é utilizado para expressar os resultados de reatividade vascular obtidos da pletismografia de oclusão venosa (17) (31).

A disfunção endotelial é fato evidenciado em pacientes com diabetes (32), hipertensão arterial (33) e dislipidemia (34). Há disfunção endotelial em pacientes com diabetes, mesmo quando ajustes para gênero e idade são feitos (35). Silva e colaboradores demonstraram que terapia com insulina subcutânea não interfere na função endotelial venosa em pacientes com diabetes com glicemia e pressão arterial estáveis (36). Apesar do bom controle metabólico, pacientes com diabetes apresentam função endotelial venosa e arterial

prejudicadas na presença de microalbuminúria, sugerindo que outros fatores estão envolvidos na sua patogênese (25).

Equilíbrio entre a lesão endotelial e recuperação do endotélio é de suma importância para a manutenção do endotélio íntegro, e ocorre continuamente (37). Na fase pós-natal, a formação de vasos sanguíneos ocorre através de angiogênese, arteriogênese e vasculogênese. Embora a angiogênese refira-se ao processo de crescimento de células endoteliais maduras que brotam de vasos pré-existentes por meio de migração e proliferação, o termo arteriogênese é usado para descrever a maturação dos vasos por meio de recrutamento de células do músculo liso vascular para cobrir os canais de células endoteliais e proporcionar estabilidade e controle da perfusão (38). Por muitos anos se acreditou que a vasculogênese caracterizava somente o processo de formação de vasos sanguíneos no embrião por meio de diferenciação das células precursoras (angioblastos) em células endoteliais, as quais estruturam uma rede vascular primitiva (39). Em 1997, Sahara e colaboradores demonstraram a diferenciação de células da fração mononucleada de sangue periférico humano em células endoteliais. As células foram caracterizadas inicialmente pelo fenótipo CD34+ (1% da fração mononuclear), precursor comum para células tronco hematopoiética e angioblastos, onde após sete dias em cultura observaram-se a expressão de múltiplos fenótipos endoteliais como Flk-1/KDR (Flk-1 é também conhecido como VEGFR-2 em ratos, e KDR em humanos sendo homólogo do VEGFR-2), CD31+, Tie-2 e E-selectina. Este achado demonstrou a diferenciação *in vitro* em células endoteliais, quebrando assim, o conceito de que a neoangiogênese, consistente com a vasculogênese, seria restrita à embriogênese (40). Hoje é

aceito que, logo após o nascimento, a medula óssea humana contém um subtipo de células progenitoras com capacidade de migrar para a circulação periférica e se diferenciar em células endoteliais maduras para manter a integridade dos vasos (41). Tais células foram denominadas de células progenitoras endoteliais (CPE) e podem ser quantificadas por ensaios funcionais de cultura celular e/ou imunofluorométricos por citometria de fluxo (42) (43). No entanto, ensaios de cultura celular são prejudicados pela dificuldade de padronização e prolongado tempo requerido fazendo com que a opção de análise por citometria de fluxo seja muitas vezes a mais viável e reprodutível (44).

Inicialmente, as CPE da medula óssea são caracterizadas pela expressão de três marcadores de superfície, CD133⁺, CD34⁺, e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2 ou KDR). Durante a diferenciação, as CPE perdem a expressão de CD133⁺ e começam a expressar além de CD34⁺ e KDR⁺, os marcadores CD31⁺, VE-cadherin⁺ e fator de von Willebrand (fvW), característicos de células endoteliais (45). Várias combinações de marcadores de superfície são descritos como sendo de CPE, incluindo, CD34⁺/CD133⁺/KDR⁺, CD34⁺/VE-cadherin⁺, CD45⁻/CD34⁺/KDR⁺, CD45⁺/CD34⁺/KDR⁺ (45), no entanto, CD45^{dim}/CD34⁺/KDR⁺ demonstra ser uma combinação altamente confiável para classificação desta população de células (44) (46), que representa 0,01 a 0,0001% da fração mononucleada do sangue periférico (47).

As CPE circulantes exercem função de reparo endógeno para manter a integridade da monocamada endotelial através da substituição das células lesadas. Em ratos, as CPE coletadas da medula óssea de animais saudáveis,

ao serem transplantadas por via venosa para modelos animais imunodeficientes, são capazes de se direcionar, proliferar e integrar a parede dos capilares entre os miócitos esqueléticos de membros inferiores submetidos à isquemia, bem como, os focos de neovascularização de feridas subcutâneas e de infarto do miocárdio (41). O potencial de neovascularização das CPE do sangue periférico humano foi confirmado mais tarde em ratos que aumentaram a perfusão de membros inferiores expostos à isquemia, chegando a níveis similares aos do membro não isquêmico após a infusão intracardíaca de CPE humanas (48).

O número de CPE circulantes tem sido usado como biomarcador para predição de risco cardiovascular. A correlação do número destas células com o grau de estenose aórtica (49), gravidade da doença arterial coronariana (50), fatores de risco cardiovascular (43), função endotelial avaliada por FMD (43) já foi demonstrada. Além disso, risco reduzido de morte por causas cardiovasculares, revascularização e hospitalização foi observado em indivíduos com maior número de CPE circulantes (51), demonstrando a importância desta população de células.

Em face do acima descrito, é de esperar que indivíduos com diabetes tipo 1 apresentem redução de CPE circulantes no sangue periférico. Adultos jovens com diabetes tipo 1, livres de complicações crônicas apresentam um menor número de CPE com fenótipo específico para CD34 +/ KDR + (52) e CD34+/ CD133+ / CD31+ em relação a indivíduos controles, e este número apresentou correlação positiva com função endotelial avaliada por FMD (53). Células expressando marcadores, como CD34+VE-cadherin+, CD133+VE-cadherin+ e CD133+VEGFR-2+ também estão reduzidas em pacientes com

diabetes tipo 1 quando comparados a controles saudáveis. Independente do marcador utilizado para expressar as CPE, todos demonstram correlação negativa com controle glicêmico e positivo com função endotelial avaliada por FMD (54), podendo ser potencializada a redução destas células com o estabelecimento e progressão de complicações crônicas, o que foi demonstrado, por exemplo, para retinopatia (55). Crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 já apresentam menor número de CPE em relação a controles saudáveis, demonstrando também, uma correlação inversa com a função endotelial e controle glicêmico (56) (57). Fatores como estresse oxidativo (58) e hiperglicemia (59) são apontados como sendo alguns dos determinantes para a redução do número e função das CPE no diabetes. Assim, tendo em vista que a correlação positiva entre CPE e função endotelial já pode ser evidenciada em crianças e adolescentes, presume-se que as anormalidades da função endotelial que precedem o desenvolvimento de lesões arteriais clinicamente evidentes, bem como a capacidade comprometida de regeneração do endotélio resultam em um aumento do risco de desenvolvimento de alterações ateroscleróticas precoces podendo assim predizer eventos cardiovasculares futuros nesta população (60).

Várias intervenções mostraram, em pacientes com diabetes, melhorar a disfunção endotelial, tais como dieta (61), exercício físico (62), insulina (63), estatinas (64), e metformina (65). Muitas vezes, no entanto, é difícil saber exatamente se a melhora de função endotelial por estas intervenções se deveu à intervenção por si só ou à correção da hiperglicemia (66). Exercício físico é intervenção que sabidamente melhora função endotelial em indivíduos com diabetes (62) (67). No entanto, poucos estudos foram realizados em pacientes

com diabetes tipo 1, assim como a exploração de diferentes tipos de exercício nesta população específica.

2.2 Efeito da atividade física habitual na vasodilatação dependente do endotélio e no número de células progenitoras endoteliais circulantes.

A atividade física pode ser definida como “qualquer movimento corporal produzido pela musculatura esquelética que cause dispêndio energético” (68). Além da melhora da tolerância ao exercício, a atividade física habitual está associada com risco reduzido de eventos cardiovasculares e é, portanto, um componente central de prevenção primária e secundária das doenças cardiovasculares (69). De fato, há evidências de que a longevidade está associada à aptidão física em indivíduos saudáveis, em pacientes com risco cardiovascular e naqueles com aterosclerose estabelecida (70) e que uma redução na atividade física diária por apenas cinco dias já promove prejuízos na função endotelial em indivíduos saudáveis (71).

Sabe-se que a melhora na função endotelial avaliada por FMD depende de níveis elevados de atividade física habitual, tanto em indivíduos saudáveis (72), como em pacientes com doença arterial coronariana (73). Utilizando o questionário internacional de atividade física (IPAq) Siasos e colaboradores demonstraram recentemente que o níveis de atividade física diária estão associados com a FMD de indivíduos de meia idade e idosos (74). Em adolescentes, os níveis de atividade física diária também associaram-se fortemente com FMD (75) demonstrando a importância de uma vida

fisicamente ativa independente da idade para manutenção ou aprimoramento da capacidade de dilatação dependente do endotélio.

Aumento significativo no número de CPE foi observado quando um volume de caminhada igual ou maior a 4 horas por semana foi realizado por pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (76). O aumento nesta população de células também foi demonstrado em pacientes com doença arterial coronariana que apresentavam maior dispêndio energético diário (73). Visto que o número de CPE também aumenta em crianças quando acrescentado maior volume semanal de atividades esportivas escolares (77), podemos concluir que níveis elevados de atividade física habitual podem contribuir na melhora da disfunção endotelial por proporcionar aumento no número de CPE circulantes.

Níveis de atividade física habitual em pacientes com diabetes tipo 1 parecem não diferir de indivíduos saudáveis (78). Níveis mais elevados de atividade física em pessoas com diabetes determinam menor risco de mortalidade, porém, o dispêndio energético destes pacientes é influenciado negativamente por fatores como idade, sexo feminino, índice de massa corporal (IMC), nível de hemoglobina glicada (HbA1c) e duração do diabetes (79). Indivíduos com diabetes tipo 1 que apresentam níveis classificados como moderados de atividade física já apresentam menor risco de morte prematura por todas as causas quando comparados aos com baixos níveis de atividade física (79). Mesmo faltando evidências diretas da avaliação da função vascular e/ou número de CPE com atividade física habitual em indivíduos com diabetes tipo 1, podemos inferir a importância do envolvimento de pacientes com diabetes em atividades físicas regulares e hipotetizar uma contribuição do

aprimoramento da função vascular e das CPE nos benefícios da atividade física regular nestes pacientes.

2.3 Efeitos agudos do exercício físico aeróbico na vasodilatação dependente do endotélio.

O exercício diferencia-se da atividade física por ser planejado, estruturado e repetitivo (treinamento físico) e ter como objetivo final ou intermediário a melhoria ou manutenção do condicionamento físico (68). Uma única sessão máxima ou submáxima de exercício pode aumentar a capacidade vasodilatadora dependente do endotélio. Teste cardiopulmonar de esforço máximo em cicloergômetro promove aumento da hiperemia reativa no antebraço em mulheres saudáveis após 10 e 60 minutos do teste, porém, a resposta induzida pelo exercício desaparece quando analisada em tempos mais prolongados como 2 horas (80). Em homens jovens saudáveis uma sessão aeróbica submáxima por 30 minutos em intensidade de 65% do $VO_{2\text{pico}}$ não foi capaz de aumentar a hiperemia reativa do antebraço 60 minutos pós-teste (81). Em nosso laboratório já demonstramos que pacientes com insuficiência cardíaca apresentam melhora significativa na hiperemia reativa do antebraço após uma sessão de exercício aeróbico em bicicleta ergométrica quando realizado por apenas 25 minutos. Esse efeito permaneceu por tempo semelhante aos encontrados nos indivíduos saudáveis, no entanto, em menor proporção, o que demonstra atenuação na hiperemia reativa em resposta ao exercício nesta população (82). Apesar da resposta vascular atenuada, estes

resultados evidenciam que uma única sessão de exercício de curta duração induz um efeito remoto em pacientes com insuficiência cardíaca, o que pode contribuir para a adaptação endotelial sistêmica que ocorre com o treinamento aeróbio crônico.

Comparando uma sessão aguda de exercício aeróbico por apenas 15 minutos em intensidade de 75% da frequência cardíaca máxima ($FC_{máx}$) a uma de exercício incremental, aumento de carga em 20 watts a cada 3 minutos, em ergômetro para membros superiores, demonstrou-se em indivíduos saudáveis sedentários que ambas as estratégias de exercício proporcionam aumento do diâmetro da artéria braquial (83). Tjonna e colaboradores compararam em pacientes com síndrome metabólica uma sessão de exercício aeróbica realizado de maneira intervalada, caracterizada por apresentar pequenos momentos em intensidade alta acompanhado por pequenos intervalos de descanso, contra uma sessão contínua. Os resultados demonstraram que ambas as intervenções melhoram a FMD imediatamente após o exercício, porém, com maior efeito na sessão intervalada. O efeito agudo da sessão durou 24 horas no grupo com exercício contínuo e 48 horas no intervalado, (84) demonstrando o efeito da intensidade sobre a resposta endotelial frente ao exercício aeróbico.

2.4 Efeitos crônicos do treinamento aeróbico na vasodilatação dependente do endotélio.

O treinamento físico aeróbico tem demonstrado ser capaz de melhorar a hiperemia reativa, FMD, assim como aumentar o número de CPE circulantes em diferentes populações (82) (16) (85). Quando realizado por 40 minutos em alta intensidade, 80 a 90% do volume de oxigênio de pico ($VO_{2\text{pico}}$), três vezes por semana por apenas dois meses, o treinamento aeróbico aumentou significativamente a FMD de pacientes que tinham feito transplante cardíaco (86). De forma semelhante através de um programa de treinamento aeróbico com duração de seis meses, Silva e colaboradores encontraram melhora na FMD em pacientes com diabetes tipo 2 (16). O mesmo benefício vascular é visto em mulheres hipertensas com sobrepeso/obesidade que realizaram treinamento aeróbico três a quatro vezes por semana durante seis meses em intensidade de 50% do $VO_{2\text{pico}}$ (87). Já em pacientes com infarto agudo do miocárdio recente, um mês de treinamento aeróbico parece ser suficiente para melhorar a FMD, porém, estes benefícios desaparecem após um mês de destreinamento (88), demonstrando a importância da prática regular de exercício aeróbico.

Interessantemente, apenas duas vezes de treinamento aeróbico por semana, em intensidade de 50% do volume de oxigênio máximo ($VO_{2\text{máx}}$) estimado, melhora a FMD de pacientes com hipertensão leve, porém, não em indivíduos saudáveis (14), sugerindo que em indivíduos com disfunção

endotelial, mesmo baixas frequências de exercício podem proporcionar melhora na função endotelial.

Em pacientes com diabetes tipo 2, independente do controle glicêmico, o treinamento aeróbico realizado por três meses melhorou a FMD e reduziu eventos cardiovasculares em 24 meses (62). Em crianças com diabetes tipo 1, duas vezes por semana de treinamento aeróbico envolvendo membros inferiores promove melhora na FMD avaliada em membros superiores (89). Isso indica que a adaptação vascular induzida pelo treinamento físico não se restringe somente aos membros treinados. Neste sentido o efeito em diferentes regiões vasculares tem sido denominado como adaptação endotelial sistêmica ou remota (15) (30) (17). O efeito remoto do treinamento aeróbico também foi descrito para pacientes adultos com diabetes tipo 1 após quatro meses de treinamento em bicicleta por 60 minutos realizado três vezes na semana a 60% da frequência cardíaca de reserva (FC_{Res}), no entanto, os indivíduos retornaram aos níveis basais de FMD após o mesmo período de destreinamento (90). Redução de trombotomodulina, marcador de lesão endotelial, também foram descritos com 30 minutos de treinamento aeróbico, realizado três vezes na semana durante três meses, em intensidade de 60 a 70% do VO_{2max} em pacientes com diabetes tipo 1 reforçando a importância do treinamento aeróbico regular na melhora da disfunção endotelial encontrada nesta população (91).

2.5 Efeitos agudos do exercício aeróbico no número de células progenitoras endoteliais circulantes.

Em indivíduos saudáveis uma única sessão de exercício em intensidade aproximada a 80% do $VO_{2\text{máx}}$ realizado por 30 minutos determinou aumento no número de dois fenótipos de CPE (CD34+/KDR+ e CD133+/CD34+/KDR+) 20 minutos após a intervenção. Interessantemente a inibição do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) nestes indivíduos interfere diretamente na capacidade do exercício em induzir aumento no número destas células sugerindo uma dependência da capacidade do endotélio em disponibilizar óxido nítrico (NO) à circulação periférica para ocorrer a liberação via medula óssea de CPE (92). Uma vez que a FMD e hiperemia reativa apresentam maior resposta com intensidades de esforço maiores (84) (80), estes achados sugerem que a intensidade escolhida para a sessão de exercício aeróbico realizado de maneira aguda poderia determinar o volume de liberação das CPE para a circulação periférica.

Contraopondo esta ideia, Laufs e colaboradores demonstraram que corrida em intensidade mais elevada, aproximadamente 82% do $VO_{2\text{máx}}$, não demonstra induzir maior volume de células CD34+/KDR+, e sim, ser capaz de acelerar a resposta da medula óssea na liberação pós-exercício, 10 minutos, em relação a intensidades mais baixas como 68% do $VO_{2\text{máx}}$, por 30 minutos (93). Quanto à cinética de liberação destas células durante o exercício, uma dependência do descolamento de células endoteliais maduras da parede vascular durante o aumento de fluxo sanguíneo induzido pelo exercício

também parece ser um dos determinantes para dar início à complexa cadeia de reações que determina a liberação de CPE em indivíduos saudáveis. Isso pode ser evidenciado pela resposta de indivíduos treinados a um protocolo contínuo em bicicleta estacionária realizado por 4 horas em intensidade de aproximadamente 80% da $FC_{máx}$ onde uma correlação positiva entre células CD34+/KDR+ e CD133+/KDR+ com células endoteliais maduras circulantes (CD146+) foi observado, assim como uma proximidade do pico de liberação destes ao término da sessão (94). Sabe-se que pacientes submetidos a angioplastia coronariana (95), que tiveram síndrome coronariana (96), doença coronariana aguda e crônica (97), assim como, pacientes com diabetes (98) (99) já possuem elevação do nível de células endoteliais CD146+ na circulação associada à disfunção endotelial, no entanto, ainda não é claro a resposta destas células frente ao exercício para inferir sua contribuição no mecanismo de sinalização para liberação de CPE em populações com função endotelial comprometida.

2.6 Efeitos crônicos do treinamento aeróbico no número de células progenitoras endoteliais circulantes.

Quando o objetivo é analisar intervenções não medicamentosas sobre o número de CPE e fatores envolvidos, o treinamento aeróbico tem sido foco de vários estudos. Em idosos, uma intervenção de 12 semanas de treinamento aeróbico realizado por apenas 30 minutos, três vezes na semana, determina atenuação na redução da capacidade de reparação do endotélio pelas CPE

decorrente a idade (100). Isso pode ser evidenciado pelo aumento do número de CPE circulantes no sangue periférico destes idosos, maior sinalização do receptor CXC4 (CXCR4) nas CPE, responsável por guiar e reter estas células em locais lesados via a quimiocina denominada fator derivado de célula estromal-1(SDF-1) (101), assim como, quando transplantado as CPE para ratos com lesão de artéria carótida, maior direcionamento e fixação das células nos locais lesados (100).

Em pacientes com doença arterial periférica, caminhada por 50 minutos em intensidade controlada por sintomas de claudicação moderada determinou aumento no número de CPE após seis meses de treinamento realizado apenas duas vezes na semana por seis meses. No entanto, o destreinamento com o mesmo período levou à redução do número desta população de células aos níveis de base (102) demonstrando que, além da necessidade de realizar exercício regularmente, um mínimo de duas vezes por semana seria suficiente para proporcionar melhora na capacidade angiogênica e conseqüentemente melhora na função endotelial, o que pode contribuir para a redução do risco cardiovascular nesta população.

Os mesmos benefícios são verificados em pacientes com insuficiência cardíaca crônica após seis meses de treinamento realizado por 60 minutos, três vezes na semana a 10% abaixo do segundo limiar ventilatório (85). No entanto, em pacientes com doença arterial oclusiva parece ser necessário varias pequenas sessões diárias, cinco vezes na semana, com treinamento realizado até a tolerância máxima de dor isquêmica para proporcionar aumento de CPE, expressão do receptor CXC4 nas CPE e liberação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (103). O VEGF é uma citocina

multifatorial que quando ligado ao seu receptor específico (VEGFR-2) na célula endotelial tem a capacidade de proporcionar mudanças na forma, divisão e migração, fatores fundamentais para angiogênese (104). Níveis circulantes de VEGF aumentam com hipóxia celular decorrente da isquemia induzida pelo exercício (105) e demonstra associação com a liberação de CPE (106). Assim, a intensidade a ser prescrita parece determinar a efetividade do treinamento em proporcionar aumento do número de CPE na circulação periférica e deve ser levada em conta na hora de estruturar um programa de treinamento físico.

Considerando que isquemia tecidual induzida pelo exercício tem sido defendida como estímulo para aumentar o número de CPE via liberação de VEGF, Adams e colaboradores, com o objetivo de determinar o curso de tempo de liberação de CPE na circulação periférica, induziram sintomas de isquemia em pacientes com doença coronária estável utilizando um teste de esforço em bicicleta ergométrica limitado por sintomas. Após 2 horas da intervenção houve um aumento das CPE que se manteve estável até 8 horas, alcançando seu pico em 24 horas acompanhado do aumento por até 6 horas de VEGF (107). Estes resultados são de extrema importância tendo em vista que são semelhantes aos encontrados em intervenções com estatina (108) e com VEGF (106) nesta população, evidenciando a capacidade do exercício físico ser, mesmo de maneira aguda, um estímulo em potencial para amenizar a progressão da disfunção endotelial encontrada nestes pacientes. O mesmo resultado não foi observado em pacientes com insuficiência cardíaca crônica nas 24 horas posteriores ao teste de esforço máximo, porém, aumento significativo no número de células duplo positivo para CD34+/KDR+ nos controles saudáveis já pôde ser observado após 10 minutos, se mantendo

estável por 2 horas (109) (110). Estes resultados fortalecem a ideia de que doenças em estágios mais avançados podem levar a uma “fadiga” da medula óssea na produção e/ou liberação das CPE decorrentes da tentativa contínua de amenizar os danos vasculares ao longo da duração da doença.

2.7 Efeitos agudos do exercício físico resistido na vasodilatação dependente do endotélio.

Uma sessão de exercício resistido já demonstra ser capaz de melhorar a resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Em ratos hipertensos uma sessão de agachamento com vinte séries de 15 repetições realizadas em intensidade de 50% da força máxima, levou a aumento significativo na dilatação dependente do endotélio 10 minutos após a sessão (18). Um aspecto importante na adaptação vascular ao exercício é o potencial generalizado (sistêmico) o qual envolve os locais não treinados. Em nosso laboratório demonstramos que uma sessão de exercício resistido direcionado a membros inferiores em intensidade de 50% da contração voluntária máxima, com quatro séries de 10 repetições em quatro exercícios, melhora a hiperemia reativa no antebraço em pacientes com insuficiência cardíaca crônica 30 minutos após a sessão. Interessantemente o efeito remoto de hiperemia reativa foi semelhante àquele observado nos controles saudáveis (17). Estes resultados sugerem que em pacientes com insuficiência cardíaca crônica o exercício resistido pode remotamente contribuir para a adaptação vascular em áreas não treinadas.

Em mulheres com obesidade também foi encontrada maior hiperemia reativa no antebraço 15 minutos após realizarem uma sessão com cinco séries de 10 repetições máximas em um único exercício para membros inferiores (*leg press*) (111). A verificação da vasodilatação dependente do endotélio em membros não exercitados durante uma sessão aguda tem sido descrita como a mais apropriada para refletir a ação vasodilatadora do NO, já que derivados liberados no local exercitado podem se tornar um potencial fator de confusão (112). A vasodilatação proporcionada pelo exercício físico parte do maior estresse de cisalhamento sobre o endotélio em resposta ao fluxo sistólico anterógrado e fluxo diastólico retrógrado (113). Partindo deste mecanismo de ação, Thijssen e colaboradores acompanharam por três minutos a taxa de cisalhamento e o fluxo sanguíneo no membro não exercitado (antebraço) em indivíduos jovens saudáveis submetidos a três protocolos incrementais: exercício em bicicleta (60; 80 e 120 Watts), exercício resistido de extensão de perna (5,0; 7,5 e 10 kg), e caminhada em esteira (3; 4 e 5 km/h). Observou-se aumento gradual e equivalente nos três protocolos em relação ao fluxo anterógrado e taxa de cisalhamento. No entanto, o fluxo retrógrado e taxa de cisalhamento demonstrou aumento somente na caminhada e bicicleta, o que poderia prever maior potencial vasodilatador dos exercícios aeróbicos em relação aos resistidos (114).

Com o objetivo de testar se a velocidade da contração muscular influenciaria agudamente nas respostas hemodinâmicas de indivíduos jovens saudáveis, Gonzales e colaboradores estruturaram um protocolo de 30 minutos com exercício de pressão de mão (*handgrip*) realizado em alta intensidade e executada em duas velocidades na fase concêntrica (preensão) (115). Os

pesquisadores não encontraram diferença entre velocidade lenta e rápida na taxa de cisalhamento anterógrado e retrógrado. Porém, níveis mais elevados de pressão arterial média foram observados na fase concêntrica realizada de maneira lenta, o que condiz com estudos anteriores (116). Surpreendentemente após o exercício a dilatação mediada pelo fluxo reduziu na velocidade lenta e não se alterou na rápida. É bem descrito na literatura que a magnitude da dilatação das artérias durante o exercício dinâmico, seja resistido ou aeróbico, está relacionada com o estímulo físico em relação ao endotélio (113). Entretanto, alguns fatores podem contribuir para uma resposta vasodilatadora negativa. A elevação dos níveis de endotelina-1 (117), somada a maior atividade simpática e liberação de noradrenalina (118) em intensidades mais elevadas de exercício resistido pode levar a um aumento da pressão arterial que quando sustentada em níveis elevados tem demonstrado *in vitro* e *in vivo* ser capaz de reduzir a liberação de NO (119) (120). Um limiar excelente para função endotelial no exercício resistido partindo da pressão arterial ainda precisa ser investigado. No entanto, intensidades mais baixas podem estar associadas com menores estímulos mecânicos, pressão arterial e atividade simpática, e assim, proporcionar estresse de cisalhamento capaz de induzir adaptações relevantes para minimizar a disfunção endotelial.

2.8 Efeitos crônicos do treinamento resistido na vasodilatação dependente do endotélio.

O treinamento resistido, por proporcionar aos praticantes aumentos de força, minimizar a perda de massa muscular decorrente da idade, aumentar a qualidade de vida e a sensibilidade à insulina já tem sido indicado, juntamente ao treinamento aeróbico, como complemento no manejo de algumas doenças (121) (122). Casey e colaboradores treinaram mulheres sedentárias, normotensas em fase pós-menopausa, duas vezes na semana, 30 minutos/dia por 18 meses. Os pesquisadores optaram por utilizar apenas uma série de 12 repetições em intensidade de 50% de uma repetição máxima (1RM) que ao final do estudo não foi capaz de melhorar a FMD nesta população (123). Uma única série por sessão de treinamento associada a uma menor intensidade poderia justificar o resultado negativo encontrado pelo grupo de Casey já que o treinamento resistido com três séries de 10 repetições máximas é capaz de aumentar a concentração plasmática de óxido nítrico em sedentários idosos após 12 semanas de treinamento (124). Assim, parece que séries múltiplas, bem como, maior intensidade otimizam a adaptação endotelial.

Entretanto, treinamento resistido realizado com três séries de 16 repetições em intensidade moderada, 50% de 1RM, melhora a hiperemia reativa no antebraço em jovens saudáveis, enquanto intensidade elevada, 80% de 1RM com três séries de 10 repetições, não (125). Rakobowchuk e colaboradores estruturaram um protocolo de treinamento progressivo, caracterizado pelo aumento da intensidade ao longo do tempo (10 a 12; 6 a 8 e

4 a 6 repetições máximas), com três séries, cinco vezes na semana por 12 semanas em homens jovens saudáveis e não encontraram aumento na FMD (126). Talvez as taxas de cisalhamento na artéria braquial foram demasiadamente pequenas e transitórias para justificar adaptações da função endotelial da artéria, ou ainda, por se tratar de indivíduos saudáveis com endotélio totalmente funcional o treinamento poderia não ter sido capaz de induzir um estímulo adequado de estresse de cisalhamento para aumentar a disponibilidade óxido nítrico. A intensidade parece ser o determinante principal já que a hiperemia reativa do antebraço aumentou significativamente em indivíduos jovens saudáveis após um treinamento em intensidade moderada (8 a 12 repetições máximas), com três séries e realizado três vezes na semana durante seis meses (127). Reduzindo a frequência semanal para dois dias, porém, mantendo uma intensidade moderada e três séries por exercício, também melhora a FMD em mulheres jovens e de meia idade que apresentam sobrepeso, independente de mudanças no índice de massa corporal (IMC), composição corporal, pressão arterial, lipídios e glicose em jejum ou insulina (128).

Pessoas com doenças ou fatores associados à disfunção endotelial parecem responder ao treinamento resistido mais rapidamente quando comparados a saudáveis. Essa hipótese pode ser confirmada a partir da melhora da FMD em pacientes com infarto agudo do miocárdio recente que realizaram treinamento resistido para membros superiores e inferiores, quatro vezes na semana, com quatro séries de 10 a 12 repetições em 60% de 1RM, durante quatro semanas. Esse resultado foi similar aos encontrados quando expostos os mesmos pacientes ao treinamento aeróbico ou combinando

aeróbico e resistido na mesma sessão (88). Notavelmente, a melhora da FMD desapareceu após um mês de destreino (88) demonstrando a importância do treinamento físico regular na saúde vascular destes pacientes independente da modalidade escolhida.

Protocolo resistido semelhante, porém, com treinamento realizado somente para membros superiores também melhorou a FMD após quatro semanas de treinamento em pacientes com insuficiência cardíaca, fazendo uso de inotrópicos e na fila para transplante (129). No entanto, treinamento resistido envolvendo menor volume muscular, por exemplo, treinamento de pressão de mão (*handgrip*), mesmo realizado por seis semanas parece não ser capaz de minimizar a disfunção endotelial de pacientes com insuficiência cardíaca (130). Estes dados levam a acreditar que mesmo sendo mais precoces as adaptações do endotélio frente ao treinamento resistido em pessoas com doenças associadas à disfunção endotelial quando comparados a saudáveis, um maior volume de massa muscular envolvida no treinamento seria necessário para proporcionar adaptações favoráveis.

2.9 Efeitos do exercício resistido e do treinamento resistido no número de células progenitoras endoteliais circulantes.

Ainda faltam evidências diretas em relação à capacidade do exercício resistido ou do treinamento resistido em promover aumento no número de CPE. Melhora em marcadores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor - VEGF*) com uma única

sessão de exercício resistido realizado com cinco séries até a fadiga para extensão de joelho em intensidade de 20% de 1RM, porém, com oclusão de fluxo no membro treinado, já foi demonstrado em idosos (131). Em indivíduos jovens saudáveis benefício semelhante tem sido observado após treinamento resistido por oito semanas (132). Aumento no VGEF frente ao exercício resistido e ao treinamento resistido abre a hipótese de que essa resposta poderia ser acompanhada por aumento do número de CPE circulantes, no entanto, a falta de evidências diretas impossibilita maiores conclusões. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de verificar se o exercício resistido e o treinamento resistido são capazes de aumentar o número de CPE circulantes e fatores associados.

Embora o exercício físico tenha mostrado benefícios aos portadores de diabetes tipo 1, esses dados citados ainda são pouco conclusivos, não são conhecidas as diferenças entre diferentes tipos de exercício físico aplicado e nenhum destes estudos avaliou a contagem de CPE após exercício físico nesta população de pacientes. A grande parte dos estudos que analisam os efeitos do exercício físico e seu efeito sobre a função vascular não envolve pacientes com diabetes tipo 1 e abordam apenas os efeitos crônicos das atividades. Diante deste fato, é importante avaliar o efeito agudo do exercício físico através de uma sessão de exercício físico aeróbico ou resistido na função endotelial em pacientes com diabetes tipo 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358:221-229
2. Gale EA: The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002;51:3353-3361
3. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J: Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 2000;23:1516-1526
4. FEDERATION ID: Diabetes in the Young: a Global Perspective.
5. Mellitus ECotDaCoD: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S5-20
6. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland OS, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Kahn CR: Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1987;59:750-755
7. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, Gatling W, Bingley PJ, Patterson CC: Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 2003;46:760-765
8. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ: The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes* 2006;55:1463-1469
9. Tabas I, Williams KJ, Borén J: Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 2007;116:1832-1844
10. Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001;104:503-516
11. Rudijanto A: The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007;39:86-93
12. Yasue H, Matsuyama K, Okumura K, Morikami Y, Ogawa H: Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation* 1990;81:482-490

13. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC: Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-1241
14. Moriguchi J, Itoh H, Harada S, Takeda K, Hatta T, Nakata T, Sasaki S: Low frequency regular exercise improves flow-mediated dilatation of subjects with mild hypertension. *Hypertens Res* 2005;28:315-321
15. Linke A, Schoene N, Gielen S, Hofer J, Erbs S, Schuler G, Hambrecht R: Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: systemic effects of lower-limb exercise training. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:392-397
16. da Silva CA, Ribeiro JP, Canto JC, da Silva RE, Silva Junior GB, Botura E, Malschitzky MA: High-intensity aerobic training improves endothelium-dependent vasodilation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:237-245
17. Guindani G, Umpierre D, Grigoletti SS, Vaz M, Stein R, Ribeiro JP: Blunted local but preserved remote vascular responses after resistance exercise in chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol* 2012;19:972-982
18. Faria TeO, Targueta GP, Angeli JK, Almeida EA, Stefanon I, Vassallo DV, Lizardo JH: Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Appl Physiol* 2010;110:359-366
19. Tomiyama H, Yamashina A: Non-invasive vascular function tests: their pathophysiological background and clinical application. *Circ J* 2010;74:24-33
20. Félétou M, Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H985-1002
21. Förstermann U, Münzel T: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 2006;113:1708-1714
22. Vanhoutte PM: Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 2009;73:595-601
23. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancina G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ, Hypertension WGoEaEFotESo: Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and

Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005;23:7-17

24. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL: Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: A systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol* 2012;

25. Silva AM, Schaan BD, Signori LU, Plentz RD, Moreno H, Bertoluci MC, Irigoyen MC: Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 2010;33:696-700

26. Signori LU, Quadros AS, Sbruzzi G, Dipp T, Lopes RD, Schaan BD: Endothelial function in patients with slow coronary flow and normal coronary angiography. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67:677-680

27. Byström S, Jensen B, Jensen-Urstad M, Lindblad LE, Kilbom A: Ultrasound-Doppler technique for monitoring blood flow in the brachial artery compared with occlusion plethysmography of the forearm. *Scand J Clin Lab Invest* 1998;58:569-576

28. Green S, Thorp R, Reeder EJ, Donnelly J, Fordy G: Venous occlusion plethysmography versus Doppler ultrasound in the assessment of leg blood flow during calf exercise. *Eur J Appl Physiol* 2011;111:1889-1900

29. Wilkinson IB, Webb DJ: Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:631-646

30. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R: Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 2004;561:1-25

31. Yang H, Drummer TD, Carter JR: Sex differences in sympathetic neural and limb vascular reactivity to mental stress in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;304:H436-443

32. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM: Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1048-1054

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

34. Kaufmann PA, Gnecci-Ruscione T, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG: Low density lipoprotein cholesterol and coronary microvascular dysfunction in hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:103-109
35. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-2516
36. Silva AM, Penno LeM, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Schaan BD: Insulin therapy does not interfere with venous endothelial function evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1139-1142
37. Jenkins NT, Padilla J, Boyle LJ, Credeur DP, Laughlin MH, Fadel PJ: Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium. *Hypertension* 2013;61:615-621
38. Carmeliet P, Jain RK: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307
39. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674
40. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-967
41. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228
42. Mund JA, Case J: The ontogeny of endothelial progenitor cells through flow cytometry. *Curr Opin Hematol* 2011;18:166-170
43. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600
44. Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Zeiher AM, Dimmeler S: Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 2010;5:e13790
45. Steinmetz M, Nickenig G, Werner N: Endothelial-regenerating cells: an expanding universe. *Hypertension* 2010;55:593-599
46. Zerbini G, Lorenzi M, Palini A: Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;359:763; author reply 764

47. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP: Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;64:1-8
48. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T: Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3422-3427
49. Matsumoto Y, Adams V, Walther C, Kleinecke C, Brugger P, Linke A, Walther T, Mohr FW, Schuler G: Reduced number and function of endothelial progenitor cells in patients with aortic valve stenosis: a novel concept for valvular endothelial cell repair. *Eur Heart J* 2009;30:346-355
50. Kunz GA, Liang G, Cuculi F, Cuculoski F, Gregg D, Vata KC, Shaw LK, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Taylor DA, Peterson ED: Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J* 2006;152:190-195
51. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007
52. Palombo C, Kozakova M, Morizzo C, Gnesi L, Barsotti MC, Spontoni P, Massart F, Salvi P, Balbarini A, Saggese G, Di Stefano R, Federico G: Circulating endothelial progenitor cells and large artery structure and function in young subjects with uncomplicated type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:88
53. DiMeglio LA, Tosh A, Saha C, Estes M, Mund J, Mead LE, Lien I, Ingram DA, Haneline LS: Endothelial abnormalities in adolescents with type 1 diabetes: a biomarker for vascular sequelae? *J Pediatr* 2010;157:540-546
54. Sibal L, Aldibbiat A, Agarwal SC, Mitchell G, Oates C, Razvi S, Weaver JU, Shaw JA, Home PD: Circulating endothelial progenitor cells, endothelial function, carotid intima-media thickness and circulating markers of endothelial dysfunction in people with type 1 diabetes without macrovascular disease or microalbuminuria. *Diabetologia* 2009;52:1464-1473
55. Brunner S, Schernthaner GH, Satler M, Elhenicky M, Hoellerl F, Schmid-Kubista KE, Zeiler F, Binder S, Schernthaner G: Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first in vivo data. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:392-398
56. Hörtenhuber T, Rami-Mehar B, Satler M, Nagl K, Höbaus C, Höllerl F, Koppensteiner R, Schernthaner G, Schober E, Schernthaner GH: Endothelial

Progenitor Cells Are Related to Glycemic Control in Children With Type 1 Diabetes Mellitus Over Time. *Diabetes Care* 2013;

57. Głowińska-Olszewska B, Moniuszko M, Hryniewicz A, Jeznach M, Rusak M, Dąbrowska M, Łuczyński W, Bodzenta-Łukaszyk A, Bossowski A: Relationship between circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes: a novel paradigm of early atherosclerosis in high-risk young patients. *Eur J Endocrinol* 2013;168:153-161

58. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, Silvestre JS: NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 2006;169:719-728

59. Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R: Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:698-703

60. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV: Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006;37:2277-2282

61. Khoo J, Piantadosi C, Duncan R, Worthley SG, Jenkins A, Noakes M, Worthley MI, Lange K, Wittert GA: Comparing effects of a low-energy diet and a high-protein low-fat diet on sexual and endothelial function, urinary tract symptoms, and inflammation in obese diabetic men. *J Sex Med* 2011;8:2868-2875

62. Okada S, Hiuge A, Makino H, Nagumo A, Takaki H, Konishi H, Goto Y, Yoshimasa Y, Miyamoto Y: Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:828-833

63. Vehkavaara S, Mäkimattila S, Schlenzka A, Vakkilainen J, Westerbacka J, Yki-Järvinen H: Insulin therapy improves endothelial function in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:545-550

64. Dogra GK, Watts GF, Chan DC, Stanton K: Statin therapy improves brachial artery vasodilator function in patients with Type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabet Med* 2005;22:239-242

65. Mather KJ, Verma S, Anderson TJ: Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1344-1350

66. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA: Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998;97:1695-1701
67. Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, Dembo L, Stanton K, Goodman C, Taylor R, Green D: The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:860-866
68. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM: Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 1985;100:126-131
69. Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee IM: Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation* 2007;116:2110-2118
70. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE: Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 2002;346:793-801
71. Boyle LJ, Credeur DP, Jenkins NT, Padilla J, Leidy HJ, Thyfault JP, Fadel PJ: IMPACT OF REDUCED DAILY PHYSICAL ACTIVITY ON CONDUIT ARTERY FLOW-MEDIATED DILATION AND CIRCULATING ENDOTHELIAL MICROPARTICLES. *J Appl Physiol* (1985) 2013;
72. Pahkala K, Heinonen OJ, Lagström H, Hakala P, Simell O, Viikari JS, Rönkä T, Hänninen M, Sillanmäki L, Raitakari OT: Vascular endothelial function and leisure-time physical activity in adolescents. *Circulation* 2008;118:2353-2359
73. Luk TH, Dai YL, Siu CW, Yiu KH, Chan HT, Fong DY, Lee SW, Li SW, Tam S, Lau CP, Tse HF: Habitual physical activity is associated with endothelial function and endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:464-471
74. Siasos G, Chrysohoou C, Tousoulis D, Oikonomou E, Panagiotakos D, Zaromitidou M, Zisimos K, Marinou G, Mazaris S, Kampakisi M, Papavassiliou AG, Pitsavos C, Stefanadis C: The impact of physical activity on endothelial function in middle-aged and elderly subjects: the Ikaria study. *Hellenic J Cardiol* 2013;54:94-101
75. Pahkala K, Heinonen OJ, Simell O, Viikari JS, Rönkä T, Niinikoski H, Raitakari OT: Association of physical activity with vascular endothelial function and intima-media thickness. *Circulation* 2011;124:1956-1963

76. Ikeda N, Yasu T, Kubo N, Nakamura T, Sugawara Y, Ueda S, Ishikawa SE, Saito M, Kawakami M, Momomura S: Daily exercise and bone marrow-derived CD34+/133+ cells after myocardial infarction treated by bare metal stent implantation. *Circ J* 2008;72:897-901
77. Walther C, Adams V, Bothur I, Drechsler K, Fikenzer S, Sonnabend M, Bublitz B, Körner A, Erbs S, Busse M, Schuler G: Increasing physical education in high school students: effects on concentration of circulating endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008;15:416-422
78. Chantelau E, Wirth R: Habitual physical activity in adult IDDM patients. A study with portable motion meters. *Diabetes Care* 1992;15:1727-1731
79. Sluik D, Buijsse B, Muckelbauer R, Kaaks R, Teucher B, Johnsen NF, Tjønneland A, Overvad K, Ostergaard JN, Amiano P, Ardanaz E, Bendinelli B, Pala V, Tumino R, Ricceri F, Mattiello A, Spijkerman AM, Monninkhof EM, May AM, Franks PW, Nilsson PM, Wennberg P, Rolandsson O, Fagherazzi G, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Castaño JM, Gallo V, Boeing H, Nöthlings U: Physical Activity and Mortality in Individuals With Diabetes Mellitus: A Prospective Study and Meta-analysis. *Arch Intern Med* 2012;172:1285-1295
80. Bousquet-Santos K, Soares PP, Nóbrega AC: Subacute effects of a maximal exercise bout on endothelium-mediated vasodilation in healthy subjects. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:621-627
81. Collier SR, Diggle MD, Heffernan KS, Kelly EE, Tobin MM, Fernhall B: Changes in arterial distensibility and flow-mediated dilation after acute resistance vs. aerobic exercise. *J Strength Cond Res* 2010;24:2846-2852
82. Umpierre D, Stein R, Vieira PJ, Ribeiro JP: Blunted vascular responses but preserved endothelial vasodilation after submaximal exercise in chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:53-59
83. Ozcan H, Oztekin PS, Zergeroğlu AM, Ersöz G, Fiçıcılar H, Ustüner E: Doppler ultrasound evaluation of the structural and hemodynamic changes in the brachial artery following two different exercise protocols. *Diagn Interv Radiol* 2006;12:80-84
84. Tjønnå AE, Rognum Ø, Bye A, Stølen TO, Wisløff U: Time course of endothelial adaptation after acute and chronic exercise in patients with metabolic syndrome. *J Strength Cond Res* 2011;25:2552-2558
85. Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Paelinck BP, Vrints CJ, Conraads VM: Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 2010;105:665-676

86. Hermann TS, Dall CH, Christensen SB, Goetze JP, Prescott E, Gustafsson F: Effect of high intensity exercise on peak oxygen uptake and endothelial function in long-term heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2011;11:536-541
87. Swift DL, Earnest CP, Blair SN, Church TS: The effect of different doses of aerobic exercise training on endothelial function in postmenopausal women with elevated blood pressure: results from the DREW study. *Br J Sports Med* 2012;46:753-758
88. Vona M, Codeluppi GM, Iannino T, Ferrari E, Bogouslavsky J, von Segesser LK: Effects of different types of exercise training followed by detraining on endothelium-dependent dilation in patients with recent myocardial infarction. *Circulation* 2009;119:1601-1608
89. Seeger JP, Thijssen DH, Noordam K, Cranen ME, Hopman MT, Nijhuis-van der Sanden MW: Exercise training improves physical fitness and vascular function in children with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2011;13:382-384
90. Fuchsjäger-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, Wolzt M: Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1795-1801
91. Rigla M, Fontcuberta J, Mateo J, Caixàs A, Pou JM, de Leiva A, Pérez A: Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44:693-699
92. Cubbon RM, Murgatroyd SR, Ferguson C, Bowen TS, Rakobowchuk M, Baliga V, Cannon D, Rajwani A, Abbas A, Kahn M, Birch KM, Porter KE, Wheatcroft SB, Rossiter HB, Kearney MT: Human exercise-induced circulating progenitor cell mobilization is nitric oxide-dependent and is blunted in South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:878-884
93. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G: Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:407-414
94. Möbius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, Adams V: Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol* 2009;107:1943-1950
95. Bonello L, Basire A, Sabatier F, Paganelli F, Dignat-George F: Endothelial injury induced by coronary angioplasty triggers mobilization of endothelial

progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2006;4:979-981

96. Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD: Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 2005;105:526-532

97. Chong AY, Lip GY, Freestone B, Blann AD: Increased circulating endothelial cells in acute heart failure: comparison with von Willebrand factor and soluble E-selectin. *Eur J Heart Fail* 2006;8:167-172

98. McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, Kappas A: Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. *Diabetologia* 2005;48:345-350

99. Asicioglu E, Gogas Yavuz D, Koc M, Ozben B, Yazici D, Deyneli O, Akalin S: Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2010;162:711-717

100. Xia WH, Li J, Su C, Yang Z, Chen L, Wu F, Zhang YY, Yu BB, Qiu YX, Wang SM, Tao J: Physical exercise attenuates age-associated reduction in endothelium-reparative capacity of endothelial progenitor cells by increasing CXCR4/JAK-2 signaling in healthy men. *Aging Cell* 2012;11:111-119

101. Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, Liu X, Zhang XY, Wang SM, Tao J: CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2010;88:462-470

102. Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, Seidinger D, Hammer A, Gröger M, Fialka-Moser V, Gschwandtner M, Koppensteiner R, Steiner S: Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis* 2011;217:240-248

103. Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Kränkel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R: 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;111:3391-3399

104. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S: Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580:2879-2887

105. Wagner PD: The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *Biochem Soc Trans* 2011;39:1556-1559

106. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF: VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* 2000;70:829-834
107. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R: Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:684-690
108. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2885-2890
109. Van Craenenbroeck EM, Bruyndonckx L, Van Berckelaer C, Hoymans VY, Vrints CJ, Conraads VM: The effect of acute exercise on endothelial progenitor cells is attenuated in chronic heart failure. *Eur J Appl Physiol* 2011;111:2375-2379
110. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, Hoymans VY, Conraads VM: 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;104:1006-1013
111. Kingsley JD, Figueroa A: Effects of resistance exercise training on resting and post-exercise forearm blood flow and wave reflection in overweight and obese women. *J Hum Hypertens* 2012;26:684-690
112. Endo T, Imaizumi T, Tagawa T, Shiramoto M, Ando S, Takeshita A: Role of nitric oxide in exercise-induced vasodilation of the forearm. *Circulation* 1994;90:2886-2890
113. Tinken TM, Thijssen DH, Hopkins N, Black MA, Dawson EA, Minson CT, Newcomer SC, Laughlin MH, Cable NT, Green DJ: Impact of shear rate modulation on vascular function in humans. *Hypertension* 2009;54:278-285
114. Thijssen DH, Dawson EA, Black MA, Hopman MT, Cable NT, Green DJ: Brachial artery blood flow responses to different modalities of lower limb exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:1072-1079
115. Gonzales JU, Thompson BC, Thistlethwaite JR, Scheuermann BW: Association between exercise hemodynamics and changes in local vascular function following acute exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 2011;36:137-144
116. Okamoto T, Masuhara M, Ikuta K: Cardiovascular responses induced during high-intensity eccentric and concentric isokinetic muscle contraction in healthy young adults. *Clin Physiol Funct Imaging* 2006;26:39-44

117. Okamoto T, Masuhara M, Ikuta K: Relationship between plasma endothelin-1 concentration and cardiovascular responses during high-intensity eccentric and concentric exercise. *Clin Physiol Funct Imaging* 2008;28:43-48
118. Carrasco DI, Delp MD, Ray CA: Effect of concentric and eccentric muscle actions on muscle sympathetic nerve activity. *J Appl Physiol* 1999;86:558-563
119. Bilfinger TV, Stefano GB: Human aortocoronary grafts and nitric oxide release: relationship to pulsatile pressure. *Ann Thorac Surg* 2000;69:480-485
120. Lamping KG, Dole WP: Acute hypertension selectively potentiates constrictor responses of large coronary arteries to serotonin by altering endothelial function in vivo. *Circ Res* 1987;61:904-913
121. Association AD: Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care* 2012;35 Suppl 1:S11-63
122. Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ, Cardiology AHACoC, American Heart Association Council on Nutrition PyA, and Metabolism: Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2007;116:572-584
123. Casey DP, Pierce GL, Howe KS, Mering MC, Braith RW: Effect of resistance training on arterial wave reflection and brachial artery reactivity in normotensive postmenopausal women. *Eur J Appl Physiol* 2007;100:403-408
124. Maeda S, Otsuki T, Iemitsu M, Kamioka M, Sugawara J, Kuno S, Ajisaka R, Tanaka H: Effects of leg resistance training on arterial function in older men. *Br J Sports Med* 2006;40:867-869
125. Kawano H, Fujimoto K, Higuchi M, Miyachi M: Effect of combined resistance and aerobic training on reactive hyperemia in men. *J Physiol Sci* 2009;59:457-464
126. Rakobowchuk M, McGowan CL, de Groot PC, Hartman JW, Phillips SM, MacDonald MJ: Endothelial function of young healthy males following whole body resistance training. *J Appl Physiol* 2005;98:2185-2190
127. Heffernan KS, Fahs CA, Iwamoto GA, Jae SY, Wilund KR, Woods JA, Fernhall B: Resistance exercise training reduces central blood pressure and improves microvascular function in African American and white men. *Atherosclerosis* 2009;207:220-226

128. Olson TP, Dengel DR, Leon AS, Schmitz KH: Moderate resistance training and vascular health in overweight women. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:1558-1564
129. Dean AS, Libonati JR, Madonna D, Ratcliffe SJ, Margulies KB: Resistance training improves vasoreactivity in end-stage heart failure patients on inotropic support. *J Cardiovasc Nurs* 2011;26:218-223
130. Bank AJ, Shammass RA, Mullen K, Chuang PP: Effects of short-term forearm exercise training on resistance vessel endothelial function in normal subjects and patients with heart failure. *J Card Fail* 1998;4:193-201
131. Patterson SD, Leggate M, Nimmo MA, Ferguson RA: Circulating hormone and cytokine response to low-load resistance training with blood flow restriction in older men. *Eur J Appl Physiol* 2013;113:713-719
132. Yeo NH, Woo J, Shin KO, Park JY, Kang S: The effects of different exercise intensity on myokine and angiogenesis factors. *J Sports Med Phys Fitness* 2012;52:448-454

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito agudo do exercício físico aeróbico e do exercício físico resistido sobre a hiperemia reativa e células progenitoras endoteliais de pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o nível de atividade física dos participantes com diabetes mellitus tipo 1 antes de iniciarem a intervenção buscando associação entre este e a hiperemia reativa e medida de células progenitoras endoteliais circulantes.
- 2) Avaliar a hiperemia reativa e o número de células progenitoras endoteliais circulantes de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após dois tipos de exercício físico (aeróbico e resistido).

Original Articles.

**Effects of aerobic and resistance exercise on endothelial progenitor cells
and vascular reactivity in type 1 diabetes mellitus.**

Gustavo Waclawovsky^{1,5}, Daniel Umpierre^{1,5}, Franciele R. Figueira¹, Eliandra S. de Lima¹, Laiana Schneider¹, Ana P. Alegretti², Ursula S. Matte³, Ticiana C. Rodrigues^{4,7}, Jorge P. Ribeiro^{1,5,6,7} (*In Memoriam*), Beatriz D. Schaan^{1,4,6,7,8*}.

¹Exercise Pathophysiology Research Laboratory, ²Department of Clinical Pathology, ³Molecular and Protein Analysis Unit, ⁴Endocrine and ⁵Cardiology Divisions of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, ⁶Postgraduate Program in Cardiology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ⁷Internal Medicine Department of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁸Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Word count: abstract: 231; Main text, 4.790. Number of tables: 1

Number of figures: 5

***Corresponding author:** Beatriz D. Schaan, MD, ScD

Serviço de Endocrinologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, prédio 12, 4º andar , 90035-003 Porto Alegre, RS

Phone/Fax: +55 51 3359-8127

E-mail: beatrizschaan@gmail.com

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the acute effect of aerobic exercise (AER) and resistance exercise (RES) on the release of endothelial progenitor cell (EPCs) and blood flow, reactive hyperemia, vascular resistance in patients with type 1 diabetes mellitus.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: Fourteen patients (30.3 ± 1.6 yrs, HbA1c 7.7 ± 0.2 %) randomly performed 40 min of AER session ($60\% \text{VO}_{2\text{peak}}$) and RES session ($60\% 1\text{-RM}$), on different days. Venous occlusion plethysmography was performed to evaluate blood flow (BF) and reactive hyperemia (RH) in the forearm 10 minutes before and 10 minutes after each exercise session. Venous blood was collected jointly to determine by flow cytometry the number of EPCs circulating.

RESULT: EPCs did not respond acutely to a session of AER ($p= 0.330$) or RES ($p= 0.961$). Forearm BF did not increase in the AER session ($p= 0.455$), but increased in the RES session ($p= 0.009$). Vascular resistance in the forearm decreased for the AER session ($p= 0.035$) and RES ($p= 0.007$) with no difference between sessions ($p= 0.921$). The RH in the forearm increased from 29.5% after the AER session ($p= 0.022$) and 34.4% after RES ($p= 0.008$), showing no difference between sessions ($p= 0.432$).

CONCLUSION: A single session of aerobic and resistance exercise similarly increases reactive hyperemia, independently of changes in circulating EPCs in patients with type 1 diabetes.

Keywords: Exercise, type 1 diabetes, endothelial progenitor cell, acute effect.

INTRODUCTION

Type 1 diabetes is associated with increased risk for the development of cardiovascular disease and all-cause mortality (1). The risks for cardiovascular disease are substantially lower than those observed in earlier decades, suggesting that strategies to reduce complications of diabetes have been effective; however, these reductions continue to be unacceptably high for this population (2). The main contributors to this still elevated cardiovascular risk in type 1 diabetes include the difficulty to reduce traditional risk factors (2), poor glycemic control since childhood generating high plasma levels of advanced glycation end products (3), increased novel risk factors such as insulin resistance (4), inflammation (5), and endothelial dysfunction (6). Thus, novel cardiovascular risk factors should be sought and treated, as they are present even during adolescence in people with type 1 diabetes, highlighting the need for early intervention. Endothelial function is usually severely impaired in these patients (7), even when no other diseases are associated; it is associated with duration of disease, microalbuminuria, and high HbA1c levels (8).

Balance between endothelial injury and healing is very important to maintain an intact endothelium, and it is a dynamic process that occurs continuously. Endothelial progenitor cells (EPCs) derived from bone marrow migrate to the peripheral circulation and differentiate in mature endothelial cells to maintain the integrity of the vessels. Their levels were previously shown to correlate with the severity of coronary artery disease, cardiovascular risk factors and endothelium-dependent vasodilation (9) (10). In type 1 diabetes, EPCs were shown to be reduced as compared to healthy subjects (11) (12). Although this has not yet been established, factors such as oxidative stress (13), and

hyperglycemia (14) are referred to as some of the determinants to reduce EPCs in diabetes. Thus, considering the expected small number of EPCs in patients with type 1 diabetes (11) (12), but also the role of EPCs in regenerating the endothelium, in which dysfunction precedes atherosclerosis development (15), an increased risk of early atherosclerotic changes could be expected as lower levels of EPCs are observed in this population.

Circulating EPCs are rare, representing approximately 0.01% to 0.0001% of peripheral blood mononuclear cells (16). Exercise can mobilize EPCs from bone marrow, temporarily increasing their number in the peripheral circulation (17). A single exercise session has been reported to improve vasodilation in the forearm in heart failure (18), and increase the number of circulating EPCs in healthy subjects (19) (20). In type 1 diabetes, aerobic training was shown to reduce endothelial dysfunction markers (21) and improve flow-mediated dilation (22). However, although exercise has shown multiple benefits in patients with type 1 diabetes (23), none of these studies evaluated the EPCs count after exercise in this population. As the benefits of exercise can be different according to the type of exercise proposed, we hypothesize that aerobic and resistance exercises would induce a rise in circulating EPCs, but their impact would be different. The aim of this study was to determine the acute effect of two types of exercise (aerobic and resistance) on circulating EPCs, as well as on the total vasodilatory capacity in patients with type 1 diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Study participants

Fourteen men with type 1 diabetes aged 18 years or more and having at least one year of diagnosis were recruited in the endocrinology outpatient clinic of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil, and media advertisements, between March 2011 and September 2013. Women were excluded, as the number of EPCs is influenced by the menstrual cycle (24). Other exclusion criteria were severe autonomic neuropathy, established diabetic nephropathy, end stage renal disease, limb amputation, disabling peripheral arterial disease, coronary artery disease, heart failure, proliferative diabetic retinopathy, cancer, and patients who were current smokers, and who were practicing exercise regularly. Eligibility, glycated hemoglobin (HbA1c) and lipid profile were verified through medical records from the hospital. The study is in accordance with the declaration of Helsinki. It was approved by the local ethics committee and informed consent was obtained from all participants before starting the study. NCT 01899872.

Eligible patients were first contacted via telephone to be informed about the research protocols, anamneses and availability of dates for the first visit. On the first visit, participants signed an informed consent form after the study was completely explained. Thereafter, a clinical questionnaire was completed, followed by an anthropometric evaluation. The International Physical Activity Questionnaire was used to assess the level of habitual physical activity and calculate the energy expenditure of the participants according to guidance from the site (www.ipaq.ki.se). During the second visit, participants were submitted to

a cardiopulmonary stress test, and in a third visit, they were submitted to a maximal strength testing. After this, they came to the laboratory to perform the exercise sessions, which were applied according to a computed-generated random sequence. Blood sampling for analysis of EPCs and venous occlusion plethysmography were performed at baseline and after each exercise session. Participants came to the laboratory having fasted for two hours, and were asked not to perform exercises or ingest caffeine in the preceding 24 h of the day of the evaluation. They were asked to repeat the same procedures and eat a similar meal 12h before the second exercise session, which was randomized and scheduled for seven days after the first one. The exercises were performed between 8:30 and 9:30 a.m. and all procedures occurred in a quiet room in the Exercise Pathophysiology Laboratory at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, at a temperature between 20 and 22⁰C (Figure 1).

Cardiopulmonary exercise testing

A maximal graded exercise test was used to determine peak aerobic exercise capacity (VO_{2peak}), which was used to calculate exercise intensity for the acute aerobic exercise sessions. The maximal incremental exercise test was performed on an electrically braked cycle ergometer (ER-900, Jaeger, Würzburg, Germany) with increments of 20 W/minute, as previously described (25). During the test, gas exchange variables were measured by a previously validated system (Oxycon Delta, VIASYS, Healthcare GmbH, Jaeger, Germany). VO_{2peak} was considered the highest value averaged over 20s. Heart rate (HR) was continuously monitored by a 12-lead electrocardiogram (Mortara

ELI 350, USA) and blood pressure (BP) was monitored by a cuff sphygmomanometer every 2 min.

Maximal strength testing

To calculate the intensity of resistance exercise, muscle strength was measured by one repetition maximum test (1-RM), which was preceded by a mild exercise for familiarization and warm-up movement (25). The technique was demonstrated and practiced in four lower-limb exercises, including: knee extension, knee flexion (Academix, São Paulo, Brazil), leg press and calf press (World Sculptor, Porto Alegre, Brazil). Initial warm up was performed with 8 to 12 repetitions at 20 to 25% of estimated weight for the 1-RM test in a cadence of 2 seconds during the concentric phase and 2 seconds during the eccentric phase controlled by an electronic metronome. After resting for two minutes, the 1-RM test was started. The test was stopped to adjust the load when the individual performed more than 1 rep or when he could not lift the weight. When further attempts were needed, a 5-minute rest period was allowed between subsequent attempts. The weight for which an individual can perform only one repetition was determined as 1-RM.

Exercise protocols

Two exercise sessions, consisting of either aerobic exercise (AE) or resistance exercises (RE) were conducted in a random order. The aerobic exercise session was performed on a cycle ergometer (360 Embreex Brusque, Brazil) starting with a 5-minute warm up followed by 40 minutes at an intensity corresponding to 60% of the VO_{2peak} , controlled by a heart rate monitor (Polar

F1 TM, Polar Electro Oy, Helsinki, Finland), and Borg scale 6-20. The resistance exercise session started with 1 set of 15 repetitions on the leg press at 30% 1-RM for warm up followed by four exercises for the lower limbs (knee extension, knee flexion, leg press and calf press with 4 sets of 12 repetitions 60% 1-RM with 2 seconds on concentric phase and 2 seconds on eccentric phase controlled by an electronic metronome, 90 seconds of rest between sets and exercises totaling 40 minutes per session. A brace was used along the hip line of participants in extension exercises and knee flexion to preclude assistance with upper limbs.

Blood pressure, heart rate and Borg were verified in AE at baseline and every 5 minutes, while in the RE session, the monitoring was done at the beginning and at the end of the fourth set of each exercise. Capillary blood glucose levels were verified using test strips (Optium Xceed, Alameda, USA) at the baseline of the cardiopulmonary test and maximum force test and for each session, and every 10 minutes throughout the sessions.

Insulin adjustments and glucose supplementation

Participants were instructed not to use their short or ultra-short acting insulin (regular or lispro/aspart insulin), and maintain their long-acting insulin dose on the mornings of the cardiopulmonary exercise test, maximal strength test and exercise sessions, in order to avoid hypoglycemic episodes. When glucose levels were lower than 100 mg/dl during the cardiopulmonary test and maximum force test, patients received 30-45 grams of glucose gel (Gli Instan, Lightsweet™) to reach values higher than 120 mg/dl. On the days of the exercise sessions, a snack was provided to participants that had blood glucose

levels lower than 150 mg/dL on arrival at the laboratory (before the test); after 15 minutes glucose levels were rechecked. The exercise started only when the glucose reached levels higher than 150 mg/dl, but lower than 250 mg/dl. If glucose levels were more than 250 mg/dl, urine was tested for the presence of ketones (ComboStik™, Gyung-Nam Korea); exercise started only if these levels were negative. Glucose levels lower than 100 mg/dl during the exercise sessions were followed by interruption of the test, patients were offered a snack and a new session was scheduled for the following week (26)

Assessment of endothelial progenitor cell count

A 20 ml blood sample for EPCs was collected in a sodium heparin Vacutainer™ tube in the dominant forearm. Blood was drawn 10 minutes before the exercise session and 10 minutes after, during the interval between measuring blood flow and reactive hyperemia. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by the Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) (27) and EPCs were defined as CD34⁺/KDR⁺/CD45^{dim} as previously described (28). Briefly, blood samples were diluted once with Phosphate Buffered Saline (PBS) and layered onto Ficoll-Paque in 15-ml conical tubes (BD; Biosciences, San Jose CA, USA). Each tube was centrifuged at 400 g for 30 min (Eppendorf - 5810, Hamburg, Germany) and the PBMC at the interface were collected. Cells were washed once with RPMI-1640 medium (Gibco™, Vancouver, Canada). The cells were stained with 5 µl of antihuman-CD45-FITC, 5 µl of antihuman-CD34-PE and 8 µl of antihuman-KDR-Alexa Fluor 647 (BD, Biosciences, San Jose CA, USA). Thereafter, 50 µl of PBS were added to resuspend cells and incubated in the dark for 30 min for subsequent

addition of 500 ul of PBS for purchase. Flow cytometry was performed using a FACSCalibur flow cytometer using CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) equipped with 22 mW argon laser tuned at 488 nm, the total number of cells counted being 200,000 on mononuclear cells gated per sample. The percentage of CD34⁺ cells was calculated based on the measured number of leukocytes (CD45⁺ cells) using the ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) gating strategy (29). The samples were analyzed at intervals of 4 to 5 hours after the beginning of exercise sessions. The gating strategy for CD34⁺/KDR⁺/CD45^{dim} cells is shown in Figure 2.

Forearm blood flow and reactive hyperemia

We evaluated blood flow responses and reactive hyperemia in the non-exercised limb (forearm) at baseline and after AE and RE. After 5 minutes sitting, baseline BPs was measured in triplicate on the arm with the highest value and the average value was adopted. After a 20 minute rest lying down, blood flow, reactive hyperemia and BP were measured (10 minutes pre-exercise), followed by the exercise. Immediately after the exercise intervention, the patient returned to the lying position for the postexercise assessment of blood flow and BP (5 minutes after the AE and RE sessions) followed by reactive hyperemia (10 minutes post-exercise). During the blood flow measurements, BP was measured each minute. Blood flow was measured using venous occlusion plethysmography (DE Hokanson, Washington, USA) in the non-dominant forearm, as described previously (18). In short, a handle rapid filling was used in the upper arm to occlude venous flow (50-60 mmHg), and three blood flow recordings were made every minute for 3 minutes. Forearm

vascular resistance was calculated as the mean BP divided by blood flow and expressed as units. Reactive hyperemia was measured using an occlusion at 250 mmHg for 5 minutes, which was released at 10-second intervals for 2 minutes. Reactive hyperemia, which reflects the total vasodilatory capacity in the measured limb, was calculated using the peak blood flow after the 5-minute occlusion. All flow recordings were manually traced by an operator who was blinded to the condition and time. The reproducibility of blood flow measurements in our laboratory has intraday and interday coefficients of variation of 6.9 and 9.2%, respectively (18).

Statistical analysis

Values are reported as means \pm SEM. Two-tailed paired t tests were used to compare differences in fasting time between the two exercise sessions. Intragroup analyses of cellular and hemodynamic variables were performed using Generalized Estimating Equation (GEE) for repeated measures. Intergroup comparisons of cellular and hemodynamic variables were performed by GEE adjusted for baseline values. Differences in glycemic responses within the exercise sessions were analyzed by GEE adjusted for baseline values. Spearman non-linear correlation was used to test the association between the variables analyzed. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$. Data were analyzed using SPSS version 20 (Chicago, IL).

RESULTS

All participants were using multiple daily insulin injections (NPH or glargine plus lispro or regular). Participant characteristics are shown in Table 1. Postprandial time for the start of AE (154.7 ± 8.6 min) and RE (165.6 ± 10.8

min) exercises was not different between the sessions ($P= 0.076$). All patients reported having repeated the last 12h meal described in the first session. Capillary blood glucose levels at the beginning of the AE session (225.4 ± 3.7 mg/dl) and RE session (218.9 ± 4.8 mg/dl) did not differ ($p= 0.382$). Only one patient required correction of blood glucose in the day sessions of AE and RE exercises. Hypoglycemia occurred in another patient who applied 50% insulin lispro in the morning session of aerobic exercise.

Progenitor cell responses to AE and RE exercise sessions

Figure 3 shows the response of EPCs in the acute exercise sessions. There were no differences in circulating CD34+ cells in response to one session of AE ($0.0510 \pm 0.0170\%$ vs. $0.0450 \pm 0.0076\%$, $p= 0.602$) or RE ($0.0340 \pm 0.0170\%$ vs. $0.0360 \pm 0.0037\%$, $p= 0.557$). In addition, CD34+ cells response to exercise was not different between AE ($-0.0008 \pm 0.0044\%$) and RE sessions ($-0.0032 \pm 0.0029\%$) ($p= 0.544$). There were no differences in EPCs (CD34+/KDR+/CD45^{dim}) in response to one session of AE ($0.0097 \pm 0.0042\%$ vs. $0.0068 \pm 0.0016\%$, $p= 0.330$) or RE ($0.0073 \pm 0.0021\%$ vs. $0.0072 \pm 0.0099\%$, $p= 0.961$). The magnitude of the effect of exercise was not different between AE ($-0.0021\% \pm 0.0009\%$) and RE ($-0.0009 \pm 0.0010\%$) ($p= 0.471$). No associations were found between responses of CD34+ and CD34+/KDR+/CD45^{dim} with age, body mass index (BMI), HbA1c, total cholesterol, triglycerides, insulin dose on the day of the session, weekly caloric expenditure, VO_{2peak} and with changes in capillary blood glucose levels to exercise in participants.

Remote vascular responses to aerobic and resistance exercise

Figure 4 shows the response of blood flow, reactive hyperemia and vascular resistance of the forearm at the AE and RE exercise sessions. Although we did not find differences in forearm blood flow after the AE session (3.75 ± 0.52 vs. 4.13 ± 0.41 ml/10ml tissue/min, $p= 0.455$), we observed increases after the RE session (2.97 ± 0.26 vs. 3.71 ± 0.36 ml/10ml tissue/min, $p= 0.009$). The magnitude of the effect for blood flow was not different between AE (0.60 ± 0.38 ml/10ml tissue/min) and RE (0.52 ± 0.31 ml/10ml tissue/min; $p= 0.879$) exercise sessions. The forearm vascular resistance decreased in AE (30.82 ± 2.86 vs. 25.32 ± 2.24 U, $p= 0.035$) and RE (36.23 ± 3.57 vs. 27.53 ± 3.33 U, $p= 0.007$). The magnitude of the effect for vascular resistance was not different between AE (-6.92 ± 2.13 U) and RE sessions (-7.28 ± 2.64 U, $p= 0.921$). Analyzing the effect of exercise on forearm reactive hyperemia, both AE (18.90 ± 2.10 vs. 24.47 ± 1.87 ml/10ml tissue/min, $p= 0.022$), and RE (15.81 ± 1.37 vs. 21.25 ± 1.33 ml/10ml tissue/min, $p= 0.008$) showed elevations. The magnitude of the effect for reactive hyperemia was not different between AE (5.86 ± 0.80 ml/10ml tissue/min) and RE (5.15 ± 0.72 ml/10ml tissue/min, $p= 0.432$). No correlation was found between blood flow, vascular resistance and reactive hyperemia with CPEs, HbA1c, total cholesterol, triglycerides, insulin units, on the day of the session, weekly caloric expenditure, VO_{2peak} and glycemic response to exercise in participants.

Glycemic response during exercise

Figure 5 demonstrates capillary blood glucose levels over time session of exercises. Compared with baseline, the AE session showed reduction in blood

glucose immediately in the first 10 minutes of exercise (225.4 ± 3.7 vs. 198.6 ± 7.6 mg/dl) and this response was only observed at the end of the session in RE (218.9 ± 4.8 vs. 179.1 ± 8.9 mg/dl). The blood glucose levels were lower in AE (182.4 ± 9.7 mg/dl) than RE (209.8 ± 9.4 mg/dl) only 20 minutes from the session ($p = 0.047$). This difference remained after 30 minutes (155.1 ± 10.5 vs. 192.5 ± 10.8 mg/dl, $p = 0.002$) and at the end of the session (143.7 ± 11.1 vs. 179.1 ± 8.9 , $p = 0.0001$). The magnitude of the effect of capillary blood glucose levels was higher in the AE session (181.1 ± 7.1 mg/dl) compared to RE exercise (203.3 ± 7.1 mg/dl) ($p = 0.009$).

No associations were found with changes in capillary blood glucose levels in AE ($r = -0.275$, $p = 0.332$) and RE ($r = -0.192$, $p = 0.501$) in response to reactive hyperemia. The same was applied to units of insulin on the morning session of aerobic exercise ($r = 0.516$, $p = 0.056$) and resistance exercise ($r = -0.225$, $p = 0.425$).

DISCUSSION

The major new finding of this study is that a single bout of submaximal aerobic or resistance exercise did not increase the number of circulating EPCs in patients with type 1 diabetes. In contrast, both interventions improved reactive hyperemia in the untrained limb, indicating a remote beneficial vascular effect of exercise. To our knowledge, this is the first study that compared the effects of aerobic and resistance exercises to the number of circulating EPCs and remote vascular effects in these patients.

Circulating EPCs are detached when endothelium is activated and its integrity is lost; they can be measured in the circulation by flow cytometry.

Changes levels of these cells in patients with atherosclerosis suggest a relationship between their number in the peripheral circulation and the extent of endothelial injury. These observations indicate that EPCs could be used for quantification of endothelium dysfunction (30). A single phenotype to express circulating EPCs in peripheral blood is still a matter for discussion. A lower number of EPCs expressing phenotype CD34+/KDR+ predicts the occurrence of cardiovascular events and death from cardiovascular causes (10). Schmidt-Lucke and colleagues demonstrated the strong potential of a low number of EPCs (CD34+/KDR+) to predict the progression of atherosclerotic disease (31). However, fractions with peripheral blood mononuclear CD34+/KDR+ cells may also characterize leukocytes (CD45+) (32). The same authors later divided CD34+/KDR+ into subpopulations (CD45^{dim} and CD45^{brith}), and showed that CD45^{dim} (more immature), but not CD45^{brith} (more mature), are stronger determinants for cardiovascular events (28). In this regard, circulating CD34+/KDR+/CD45^{dim} has been recommended to reflect the set of EPCs (33).

In the present study, a session of aerobic or resistance exercises did not induce changes in the number of EPCs in the peripheral blood of patients with type 1 diabetes. In healthy individuals, a session of moderate aerobic exercises for 30 minutes showed increased CD34+/KDR + cells and CD34+ cells 20 minutes after the end of the session. An increase in flow-mediated dilatation (FMD) in the untrained limb (arm) was also observed and positively correlated with the number of EPCs. Interestingly, the inhibition of NO synthase prevented EPCs rise, demonstrating a direct dependence of NO for the release of these cells into peripheral circulation (19). One of the mechanisms postulated for this

response is the contribution of NO in modulating the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the bone marrow (34), that is required to mobilize and enable the transfer of EPCs to the proliferation niche (35).

In healthy individuals, Van Craenenbroeck and colleagues demonstrated an increase in the number of CD34+/KDR+, but not CD34+ 10 minutes after cardiopulmonary exercise testing (20). Repeating the protocol, but evaluating the behavior of progenitor cells for 24h, the same authors reported an increase in the number of CD34+/KDR+ 10 minutes after completion of the test only in healthy subjects (36), but not in patients with heart failure. It is possible that the release of bone marrow progenitor cells into the peripheral circulation could be attenuated in these patients. Since aerobic training for 6 months showed an increased number of CD34+/KDR+ without modification in CD34+, they concluded that the attenuated response observed in this population occurred specifically after acute, but not after chronic stimulation (17). An attenuation of the bone marrow in response to acute stimulation by exercise can be partly explained by the smaller number and functional capacity of hematopoietic stem cells and EPCs in the bone marrow of patients with more advanced stages of cardiovascular disease (37).

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a cytokine that when linked to its specific receptor (VEGFR-2) can induce changes in endothelial cells that are key factors for angiogenesis (38). This growth factor can be stimulated by muscle contraction and release of NO derived from shear stress imposed by increased blood flow during exercise (39), being associated with the rise in circulating EPCs (40). Thus, VEGF could in part provide an idea of the potential of resistance exercise on the release of EPCs into the peripheral circulation. In

healthy young subjects, moderate-intensity exercise leads to greater increases in plasma VEGF, as compared to higher intensity exercise (41). Gavin and colleagues demonstrated increased plasma VEGF in young sedentary subjects after resistance exercise for knee extension (42). However, no increases in VEGF were shown in older individuals after resistance training for 12 weeks (43). From childhood to adulthood individuals with type 1 diabetes carry a reduction of circulating EPCs, which is associated with endothelium-dependent vasodilation reduction (11) (12). Thus, an explanation for the failure to increase the number of circulating EPCs in our patients on either exercise protocol could be due to a decrease in bone marrow progenitor cells over time, as a result of endothelial dysfunction, as already shown in patients with heart failure (36).

Exercise intensity (44) and duration (45) may affect the response of the EPCs. We used similar sessions in lower limbs, which reduced the interference of these factors in the data comparison. Age (36), high blood glucose levels (14), and dyslipidemia (20) could also affect the response of EPCs to exercise. However, we found no relation between changes in EPCs after both exercise sessions and any of these variables. The time effect found in the EPCs after the end of the exercise showed that this effect lasted only 24 hours; thus, we can rule out that a "carry over" effect could interfere with these results (36). The heterogeneity in exercise protocols, few studies involving acute responses to exercise in similar populations, as well as lack of standardization in the evaluation and phenotype of circulating EPCs largely limits comparisons with other studies. However, using a phenotype of EPCs demonstrated as the most appropriate and using both exercise sessions following the recommendations for patients with type 1 diabetes (26) reinforces the consistency of our results.

Interference reduction in lymphocyte population of EPCs in the works cited above (20) (17) (36) was done by including marker CD3- to CD34+/KDR+ to exclude lymphocytes (CD3) providing good comparisons with the EPCs expressed by CD34+/KDR+/CD45^{dim} used in our study. The lymphocytes can be subdivided into CD3, CD19 and CD56 (46) (47) and despite the small prevalence of CD19 and CD56 compared to peripheral blood CD3 (46) (47), these cells could also interfere with results.

We showed that both exercise sessions, aerobic or resistance, performed in the lower limbs similarly improved reactive hyperemia and vascular resistance in the forearm of patients with type 1 diabetes. However, only aerobic exercise was able to improve the forearm blood flow. In healthy subjects one session of aerobic or resistance exercise improved flow-mediated dilatation in the forearm (48); improvement in forearm reactive hyperemia is observed with aerobic or resistance training in patients with hypertension (49). We have demonstrated that a single 25-min session of aerobic (18) or resistance exercise (50) in the lower limbs induced an improvement in blood flow, vascular resistance and reactive hyperemia of the forearm of healthy subjects and in patients with heart failure. A six-month duration aerobic training program improved flow-mediated dilatation in patients with type 2 diabetes independent of the low or high training intensity (51), as well as its combination (52). This was observed also for type 1 diabetic patients (22). The vascular benefits of training returned to baseline levels after an eight-month period of detraining (22), indicating the importance of continued stimulation to promote vascular adaptations in limbs not involved in the exercise and reverse the endothelial dysfunction found in this population (11).

Adaptations in endothelial function in the upper limbs after training with lower limbs occur through shear stress (53), being able to provide endothelium adaptations and to increase reactive hyperemia due to NO release (54). Different types of standard shear stress rates imposed by aerobic and resistance exercise are described and may have a different impact on the release of endothelial NO, highlighting the potential for a particular modality (55). As we did not demonstrate a difference in reactive hyperemia between sessions, we hypothesize that the intensities of exercise we chose can minimize these differences and provide similar chronic adaptations. Exogenous insulin improves endothelial function (56), but its regular use in type 2 diabetic patients was not shown to influence endothelial function evaluation (57). Moreover, insulin doses injected on the morning of the protocols were the same for both sessions and showed no association with any of the vascular responses assessed.

Blood flow increases in the exercised muscles (58) and is reduced in resting muscles (59), demonstrating its redistribution during exercise. Increased blood flow in the non-exercised limb is observed after exercise, persisting for more time after a session of resistance exercise (50) when compared with aerobic exercise (18). The increase in forearm blood flow found in our patients only after resistance exercise could indicate the greatest redistribution of blood for the muscles trained during aerobic exercise as compared to resistance exercise. This could determine a lower response in the upper limb after the session of aerobic exercise. However, blood flow in the exercised muscles was not assessed, hindering major explanations.

We also observed a continued decrease in blood glucose levels 10 minutes after the beginning of the session of aerobic exercise, similarly to other authors (60). The decline in blood glucose levels in resistance exercise occurred only at the end of the session. This was similar to what Yardley and colleagues (60). Catecholamines provide increased hepatic glucose production (61) and simultaneously inhibit the uptake of glucose via insulin (62) which coupled to growth hormone levels would provide even more support for the inhibition of glucose uptake via insulin in muscles (63) during the exercise. Resistance exercise could determine greater catecholamine (64) and growth hormone release in resistance exercise sessions as compared to aerobic, explaining the attenuation in reducing blood glucose levels in our patients in the resistance exercise session. Assessing hormonal responses in exercise sessions would confirm this hypothesis.

In conclusion, our results demonstrate that a single session of aerobic and resistance exercise similarly increases reactive hyperemia, independently of changes in circulating EPCs in patients with type 1 diabetes. We underscore that such acute effects of lower-limb exercises may contribute to systemic vascular adaptation induced by regular exercise training. The unchanged number of EPCs after both exercise protocols might indicate an inability of the bone marrow to release more EPCs after this kind of stimulus. Further investigations on the chronic responses of EPCs to different types and intensities of exercises are needed.

Acknowledgments**Funding**

This work was supported by Fipe-HCPA, Porto Alegre, Brazil. GW received scholarships from CNPq, Brasília, Brazil.

Conflicts of interest

None.

REFERENCES

1. Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW: Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care* 2006;29:2528-2538
2. Livingstone SJ, Looker HC, Hothersall EJ, Wild SH, Lindsay RS, Chalmers J, Cleland S, Leese GP, McKnight J, Morris AD, Pearson DW, Peden NR, Petrie JR, Philip S, Sattar N, Sullivan F, Colhoun HM: Risk of cardiovascular disease and total mortality in adults with type 1 diabetes: Scottish registry linkage study. *PLoS Med* 2012;9:e1001321
3. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH, Tarnow L, Rossing P, Stehouwer CD: Higher plasma soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) levels are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes* 2010;59:2027-2032
4. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KY, Smithline Kinder L, Ellis D, Becker DJ: Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2003;26:1374-1379
5. Devaraj S, Cheung AT, Jialal I, Griffen SC, Nguyen D, Glaser N, Aoki T: Evidence of increased inflammation and microcirculatory abnormalities in patients with type 1 diabetes and their role in microvascular complications. *Diabetes* 2007;56:2790-2796
6. Theilade S, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L, Parving HH, Rossing P: Arterial stiffness and endothelial dysfunction independently and synergistically predict cardiovascular and renal outcome in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2012;29:990-994
7. Chan NN, Vallance P, Colhoun HM: Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1048-1054
8. Cé GV, Rohde LE, da Silva AM, Puñales MK, Coutinho MK, de Castro AC, Bertoluci MC: Endothelial dysfunction is related to poor glycemic control in adolescents with type 1 diabetes under 5 years of disease: evidence of metabolic memory. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:1493-1499
9. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600
10. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G: Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007
11. Palombo C, Kozakova M, Morizzo C, Gnesi L, Barsotti MC, Spontoni P, Massart F, Salvi P, Balbarini A, Saggese G, Di Stefano R, Federico G: Circulating endothelial progenitor cells and

large artery structure and function in young subjects with uncomplicated type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011;10:88

12. DiMeglio LA, Tosh A, Saha C, Estes M, Mund J, Mead LE, Lien I, Ingram DA, Haneline LS: Endothelial abnormalities in adolescents with type 1 diabetes: a biomarker for vascular sequelae? *J Pediatr* 2010;157:540-546

13. Ebrahimian TG, Heymes C, You D, Blanc-Brude O, Mees B, Waeckel L, Duriez M, Vilar J, Brandes RP, Levy BI, Shah AM, Silvestre JS: NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 2006;169:719-728

14. Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R: Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:698-703

15. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV: Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 2006;37:2277-2282

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

17. Van Craenenbroeck EM, Hoymans VY, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Paelinck BP, Vrints CJ, Conraads VM: Exercise training improves function of circulating angiogenic cells in patients with chronic heart failure. *Basic Res Cardiol* 2010;105:665-676

18. Umpierre D, Stein R, Vieira PJ, Ribeiro JP: Blunted vascular responses but preserved endothelial vasodilation after submaximal exercise in chronic heart failure. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009;16:53-59

19. Cubbon RM, Murgatroyd SR, Ferguson C, Bowen TS, Rakobowchuk M, Baliga V, Cannon D, Rajwani A, Abbas A, Kahn M, Birch KM, Porter KE, Wheatcroft SB, Rossiter HB, Kearney MT: Human exercise-induced circulating progenitor cell mobilization is nitric oxide-dependent and is blunted in South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:878-884

20. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, Hoymans VY, Conraads VM: 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;104:1006-1013

21. Rigla M, Fontcuberta J, Mateo J, Caixàs A, Pou JM, de Leiva A, Pérez A: Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia* 2001;44:693-699

22. Fuchsjäger-Mayrl G, Pleiner J, Wiesinger GF, Sieder AE, Quittan M, Nuhr MJ, Francesconi C, Seit HP, Francesconi M, Schmetterer L, Wolzt M: Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1795-1801

23. Tielemans SM, Soedamah-Muthu SS, De Neve M, Toeller M, Chaturvedi N, Fuller JH, Stamatakis E: Association of physical activity with all-cause mortality and incident and prevalent cardiovascular disease among patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2013;56:82-91
24. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF: Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? *Int J Cardiol* 2009;136:200-210
25. Figueira FR, Umpierre D, Casali KR, Tetelbom PS, Henn NT, Ribeiro JP, Schaan BD: Aerobic and combined exercise sessions reduce glucose variability in type 2 diabetes: crossover randomized trial. *PLoS One* 2013;8:e57733
26. Colberg SR: *EXERCISE AND DIABETES: A Clinician's Guide to Prescribing Physical Activity*. Alexandria, Virginia, American Diabetes Association, 2013
27. Mikirova NA, Jackson JA, Hunninghake R, Kenyon J, Chan KW, Swindlehurst CA, Minev B, Patel AN, Murphy MP, Smith L, Ramos F, Ichim TE, Riordan NH: Nutraceutical augmentation of circulating endothelial progenitor cells and hematopoietic stem cells in human subjects. *J Transl Med* 2010;8:34
28. Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, Tschöpe C, Schultheiss HP, Zeiher AM, Dimmeler S: Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 2010;5:e13790
29. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT: Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematol* 1999;21:301-308
30. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-1295
31. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM: Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005;111:2981-2987
32. Zerbini G, Lorenzi M, Palini A: Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;359:763; author reply 764
33. Van Craenenbroeck EM, Van Craenenbroeck AH, van Ierssel S, Bruyndonckx L, Hoymans VY, Vrints CJ, Conraads VM: Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int J Cardiol* 2013;167:1688-1695
34. Aleksinskaya MA, van Faassen EE, Nelissen J, Janssen BJ, De Mey JG, Hanemaaijer R, Rabelink T, van Zonneveld AJ: Identification of free nitric oxide radicals in rat bone marrow: implications for progenitor cell mobilization in hypertension. *PLoS One* 2013;8:e57761

35. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S: Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625-637
36. Van Craenenbroeck EM, Bruyndonckx L, Van Berckelaer C, Hoymans VY, Vrints CJ, Conraads VM: The effect of acute exercise on endothelial progenitor cells is attenuated in chronic heart failure. *Eur J Appl Physiol* 2011;111:2375-2379
37. Kisel CK, Lehmann R, Assmus B, Aicher A, Honold J, Fischer-Rasokat U, Heeschen C, Spyridopoulos I, Dimmeler S, Zeiher AM: Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2341-2349
38. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S: Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580:2879-2887
39. Hudlicka O, Brown MD, May S, Zakrzewicz A, Pries AR: Changes in capillary shear stress in skeletal muscles exposed to long-term activity: role of nitric oxide. *Microcirculation* 2006;13:249-259
40. Sandri M, Beck EB, Adams V, Gielen S, Lenk K, Höllriegel R, Mangner N, Linke A, Erbs S, Möbius-Winkler S, Scheinert D, Hambrecht R, Schuler G: Maximal exercise, limb ischemia, and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011;18:55-64
41. Yoneda K, Demitsu T, Nakai K, Moriue T, Ogawa W, Igarashi J, Kosaka H, Kubota Y: Activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in a cellular model of loricrin keratoderma. *J Biol Chem* 2010;285:16184-16194
42. Gavin TP, Drew JL, Kubik CJ, Pofahl WE, Hickner RC: Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;191:139-146
43. Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M, Suzuki K: Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators Inflamm* 2010;2010:171023
44. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G: Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:407-414
45. Möbius-Winkler S, Hilberg T, Menzel K, Golla E, Burman A, Schuler G, Adams V: Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. *J Appl Physiol* 2009;107:1943-1950
46. Al-Mawali A, Pinto AD, Al Busaidi R, Al-Zakwani I: Lymphocyte subsets: reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. *Cytometry A* 2013;83:739-744

47. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, Girotto M: An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999;84:499-504
48. Collier SR, Diggle MD, Heffernan KS, Kelly EE, Tobin MM, Fernhall B: Changes in arterial distensibility and flow-mediated dilation after acute resistance vs. aerobic exercise. *J Strength Cond Res* 2010;24:2846-2852
49. Beck DT, Martin JS, Casey DP, Braith RW: Exercise training improves endothelial function in resistance arteries of young prehypertensives. *J Hum Hypertens* 2013;
50. Guindani G, Umpierre D, Grigoletti SS, Vaz M, Stein R, Ribeiro JP: Blunted local but preserved remote vascular responses after resistance exercise in chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol* 2012;19:972-982
51. da Silva CA, Ribeiro JP, Canto JC, da Silva RE, Silva Junior GB, Botura E, Malschitzky MA: High-intensity aerobic training improves endothelium-dependent vasodilation in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:237-245
52. Okada S, Hiuge A, Makino H, Nagumo A, Takaki H, Konishi H, Goto Y, Yoshimasa Y, Miyamoto Y: Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:828-833
53. Birk GK, Dawson EA, Atkinson C, Haynes A, Cable NT, Thijssen DH, Green DJ: Brachial artery adaptation to lower limb exercise training: role of shear stress. *J Appl Physiol* (1985) 2012;112:1653-1658
54. Higashi Y, Sasaki S, Sasaki N, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, Matsuura H, Kajiyama G, Oshima T: Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999;33:591-597
55. Thijssen DH, Dawson EA, Black MA, Hopman MT, Cable NT, Green DJ: Brachial artery blood flow responses to different modalities of lower limb exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2009;41:1072-1079
56. Rask-Madsen C, Ihlemann N, Krarup T, Christiansen E, Kober L, Nervil Kistorp C, Torp-Pedersen C: Insulin therapy improves insulin-stimulated endothelial function in patients with type 2 diabetes and ischemic heart disease. *Diabetes* 2001;50:2611-2618
57. Silva AM, Penno LeM, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Schaan BD: Insulin therapy does not interfere with venous endothelial function evaluation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65:1139-1142
58. Green S, Thorp R, Reeder EJ, Donnelly J, Fordy G: Venous occlusion plethysmography versus Doppler ultrasound in the assessment of leg blood flow during calf exercise. *Eur J Appl Physiol* 2011;111:1889-1900

59. Zelis R, Mason DT, Braunwald E: Partition of blood flow to the cutaneous and muscular beds of the forearm at rest and during leg exercise in normal subjects and in patients with heart failure. *Circ Res* 1969;24:799-806
60. Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, Riddell MC, Malcolm J, Boulay P, Khandwala F, Sigal RJ: Effects of performing resistance exercise before versus after aerobic exercise on glycemia in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:669-675
61. Kreisman SH, Halter JB, Vranic M, Marliss EB: Combined infusion of epinephrine and norepinephrine during moderate exercise reproduces the glucoregulatory response of intense exercise. *Diabetes* 2003;52:1347-1354
62. Khoury N, McGill JB: Reduction in insulin sensitivity following administration of the clinically used low-dose pressor, norepinephrine. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:604-608
63. Krusenstjerna-Hafstrøm T, Clasen BF, Møller N, Jessen N, Pedersen SB, Christiansen JS, Jørgensen JO: Growth hormone (GH)-induced insulin resistance is rapidly reversible: an experimental study in GH-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2548-2557
64. Goto K, Takahashi K, Yamamoto M, Takamatsu K: Hormone and recovery responses to resistance exercise with slow movement. *J Physiol Sci* 2008;58:7-14
65. Silveiro SP, Araújo GN, Ferreira MN, Souza FD, Yamaguchi HM, Camargo EG: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation pronouncedly underestimates glomerular filtration rate in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:2353-2355

TABLES

Table 1. Clinical characteristics of subjects studied.

| Variable | Means \pm SEM |
|--|-------------------|
| Age (yr) | 30.3 \pm 1.6 |
| Duration of diabetes (yr) | 14.8 [7.7 – 19.2] |
| HbA1c (%) | 7.7 \pm 0.2 |
| Urinary albumin (mg/l) | 7.1 \pm 1.1 |
| GFR (ml/min/1.73 m ²) | 95.6 \pm 9.7 |
| BMI (kg/m ²) | 26.2 \pm 0.8 |
| Waist circumference (cm) | 88.2 \pm 2.4 |
| Systolic blood pressure (mmHg) | 117.5 \pm 3.6 |
| Diastolic blood pressure (mmHg) | 68.7 \pm 2.4 |
| Triglycerides (mg/dl) | 85.9 \pm 13.9 |
| Total cholesterol (mg/dl) | 170.6 \pm 8.4 |
| HDL cholesterol (mg/dl) | 42.3 \pm 4.6 |
| LDL cholesterol (mg/dl) | 111.2 \pm 8.8 |
| VO ₂ peak (ml/kg/min) | 37.1 \pm 1.4 |
| Physical activity level (IPAQ) | |
| Insufficiently active | 7 (50) |
| Sufficiently active | 2 (14) |
| Very active | 5 (36) |
| Maximal strength testing (1-RM) | |
| Knee extension (kg) | 97.4 \pm 4.9 |
| Knee flexion (kg) | 33.0 \pm 2.4 |
| Leg press (kg) | 152.5 \pm 9.4 |
| Calf press (kg) | 147.0 \pm 7.6 |

HbA1c: glycated hemoglobin; GFR: Glomerular filtration rate (MDRD) (65); VO₂ peak: peak oxygen uptake per kilogram of body weight. Data are expressed as mean \pm SEM. Categorical variables are presented as numbers (%). Duration of diabetes expressed as median (95% CI).

FIGURES

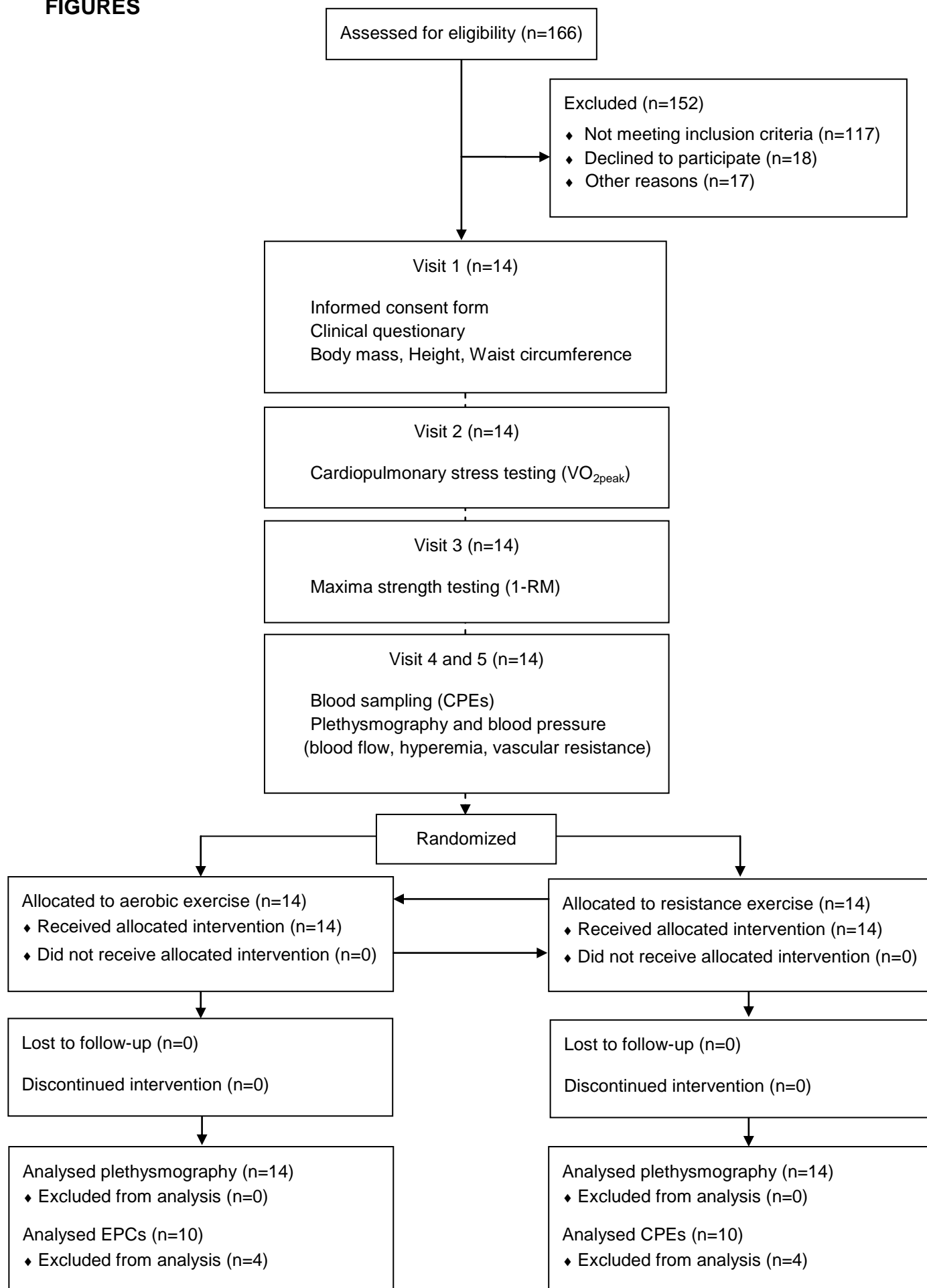


Figure 1. Flow Diagram. EPCs: endothelial progenitor cell.

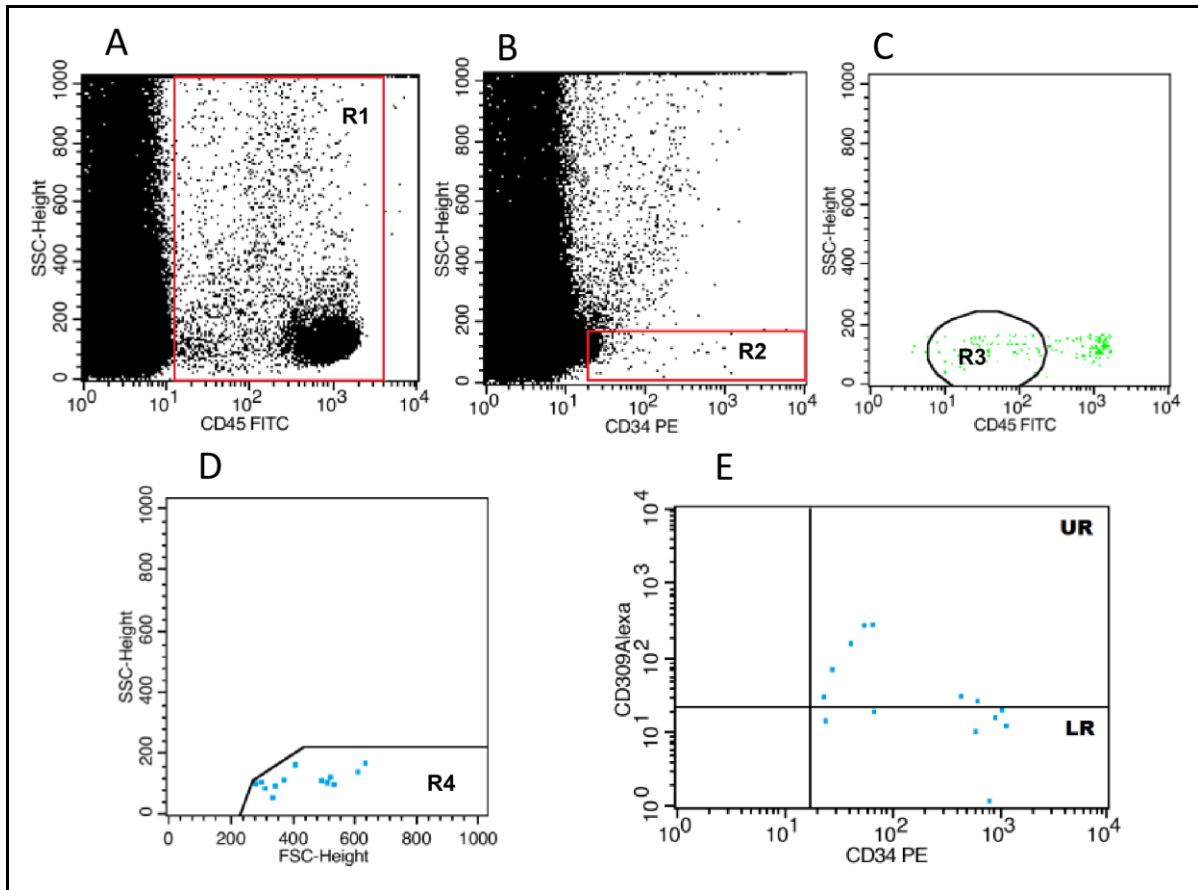


Figure 2. Analysis of peripheral-blood mononuclear cells stained with CD45-FITC, CD34-PE and KDR (CD309)-Alexa Fluor 647. **A:** The Gate1 (R1) was set on a CD45 vs. SSC dot plot to define the population of mononuclear cells (including CD45^{dim} and CD45^{bright}); The events in gate R1 are then displayed on a CD34 vs. SSC dot plot **B:** and a second gate (R2) produced to include the cluster of CD34+ events Gate (R2) for defining the population of hematopoietic stem cells (CD34+); **C:** Gate (R3): The third plot was obtained by plotting the events that fulfill the criteria of gates R1 and R2 (i.e. sequential gating) to define the population of immature lymphocytes (CD45^{dim}), are then gated on this third plot to produce a third region (R3); **D:** Gate (R4): the events fulfilling the criteria of all three gates (R1, R2 and R3) are then displayed on a forward light scatter (FSC) vs. SSC dot plot to confirm that the selected events fall into a generic 'lymph-blast' region (R4) to define the population of CD45^{dim}/CD34+; **E:** Dot plots of gated R4 cells are displayed for defining the positive population of endothelial progenitor cell (CD45^{dim}/CD34+/KDR+) on the UR (upper right) and KDR- negative cells (CD45^{dim}/CD34+/KDR-) on LR (low right).

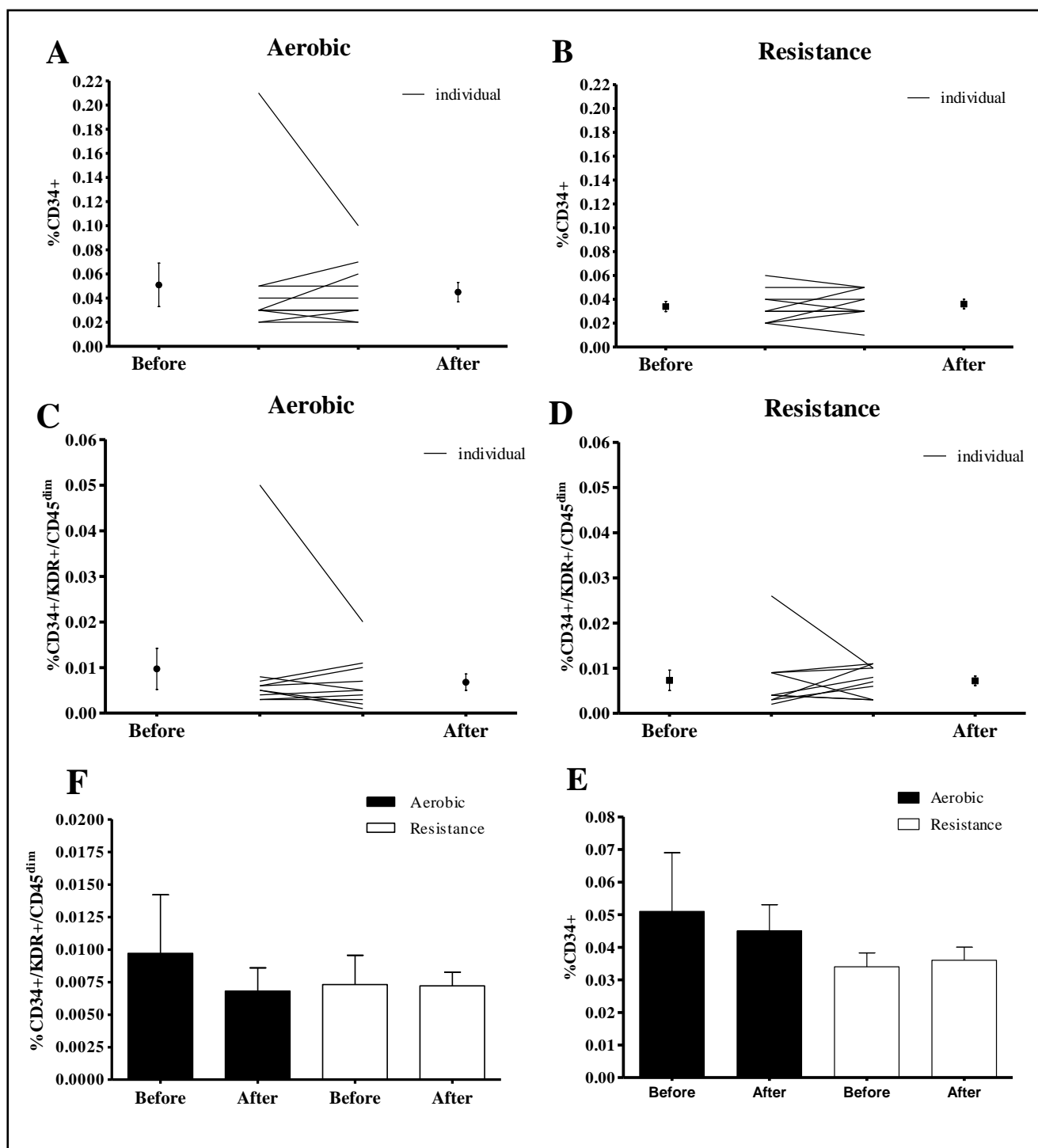


Figure 3. Data are expressed as mean \pm SEM. The lines in the graphs A, B, C and D represent the individual response of the one session of aerobic exercise and one session of resistance exercise. Values for CD34+ cell for aerobic exercise session (A) and resistance exercise session (B). Values of endothelial progenitor cells (CD34+/KDR+/CD45^{dim}) for aerobic exercise session (C) and resistance exercise session (D). Values of the response of CD34 + cells (E) in the sessions of aerobic exercise, black bar, and resistance exercise session, white bar. Values of endothelial progenitor cells (CD34 + / KDR + / CD45^{dim}) (F) in the sessions of aerobic exercise, black bar, and resistance exercise session, white bar. There were no statistically significant differences in the parameters analyzed in both sessions or between sessions ($p > 0.05$). For these analyses consider a $n = 10$.

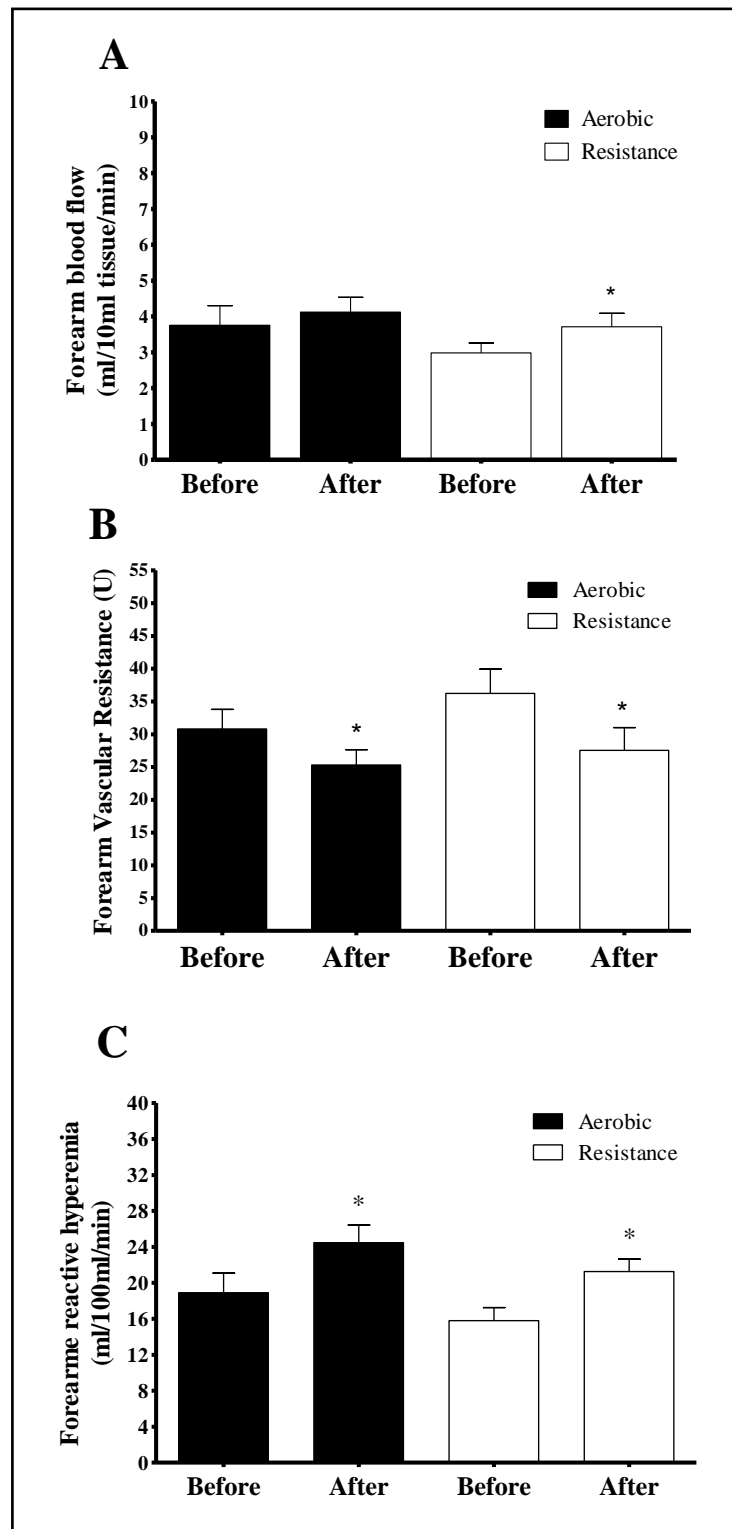


Figure 4. Data are expressed as mean \pm SEM. Responses in blood flow, vascular resistance and forearm reactive hyperemia after one session of aerobic exercise, black bar, and one session of resistance exercise session, white bar (* $p < 0.05$). No significant differences were found in the analyzed parameters between the two conditions of exercise ($p > 0.05$). For these analyses consider a $n = 14$.

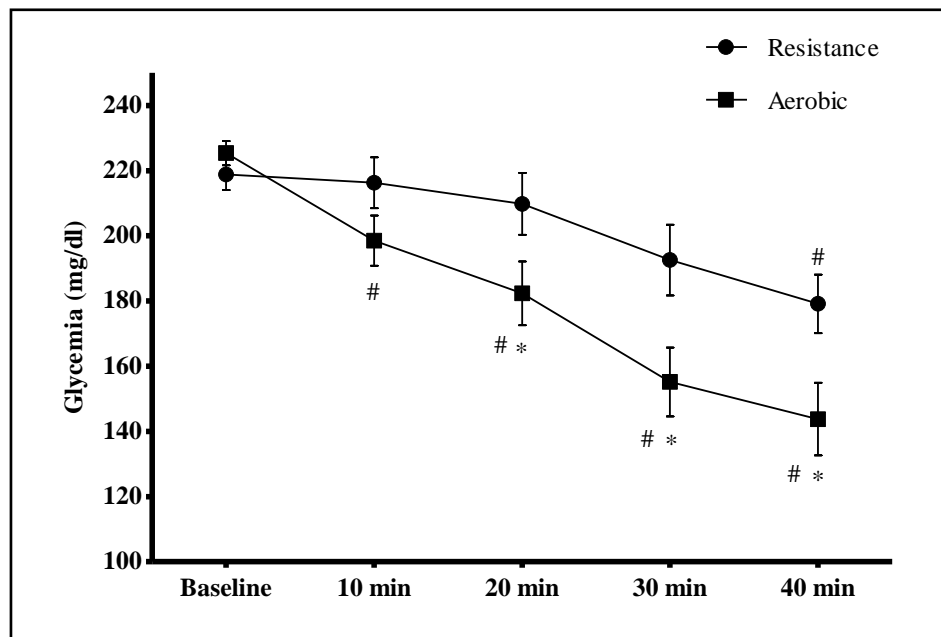


Figure 5. Data are expressed as mean \pm SEM. # Difference from baseline during one session of aerobic exercise (dark square) and resistance exercise (dark circle) ($p < 0.05$). * Difference between session ($p < 0.05$). For these analyses consider a $n = 14$.

ANEXO

Anexo 1. Classificação de intensidade para prática de exercício físico aeróbico e resistido.

| INTENSIDADE | Treinamento cardiorrespiratório | | | | Treinamento de força |
|-----------------|---------------------------------|---------|---------------------|------------|----------------------|
| | FCR (%) | FCM (%) | %VO _{2max} | PSE (Borg) | (% 1RM) |
| Muito baixa | < 20 | < 35 | <37 | < 10 | < 30 |
| Baixa | 20-39 | 35-54 | 37-45 | 11-12 | 30-49 |
| Moderada | 40-59 | 55-69 | 46-63 | 12-13 | 50-69 |
| Alta (vigorosa) | 60-84 | 70-89 | 64-90 | 14-16 | 70-84 |
| Muito Alta | ≥ 85 | ≥ 90 | ≥91 | 17-19 | ≥ 85 |
| Máxima | 100 | 100 | 100 | 20 | 100 |

FCR*= frequência cardíaca de reserva;

FCM= frequência cardíaca máxima (220-idade ou teste de esforço máximo);

VO_{2max}= consumo máximo de oxigênio;

PSE= percepção subjetiva de esforço (escala de Borg 0,6-20 pontos);

1RM= 1 repetição máxima.

Fórmula de Karvonen para prescrição pela FCR:

***FC alvo**= [(FCM– FC repouso) x intensidade desejada] + FC repouso.

Referência

Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, Nieman DC, Swain DP; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. Med Sci Sports Exerc 2011;43:1334-59.