



ANTONIO CASELLA FILHO

**Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no
endotélio de pacientes com síndrome metabólica**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Palandri Chagas

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Casella Filho, Antonio

Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com síndrome metabólica / Antonio Casella Filho. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Antonio Carlos Palandri Chagas.

Descritores: 1.Síndrome metabólica X 2.Lipoproteínas 3.Endotélio/ultra-sonografia 4.Exercício

USP/FM/SBD-303/07

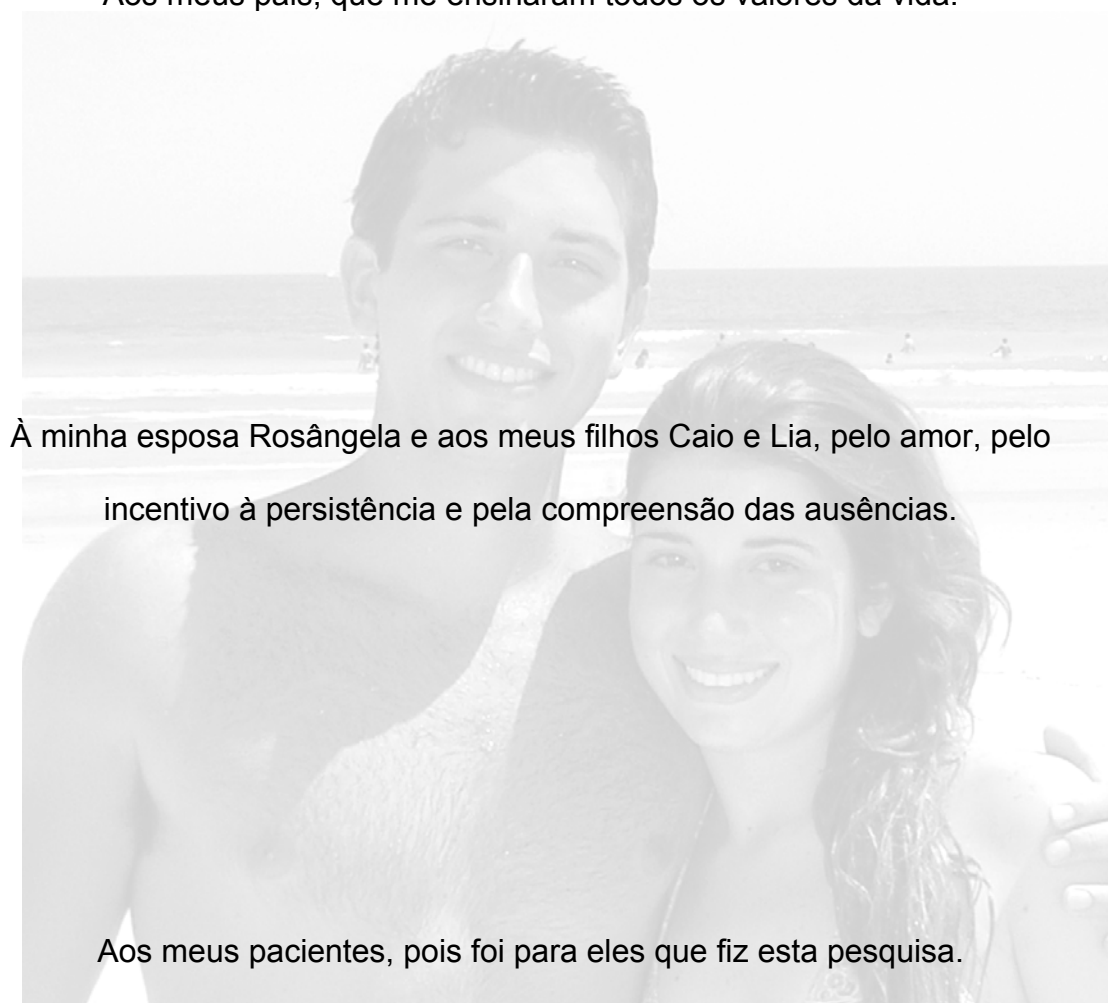
Aprenda como se fosse viver para sempre;

Viva como se fosse morrer amanhã.

Gandhi

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me ensinaram todos os valores da vida.



À minha esposa Rosângela e aos meus filhos Caio e Lia, pelo amor, pelo incentivo à persistência e pela compreensão das ausências.

Aos meus pacientes, pois foi para eles que fiz esta pesquisa.

Ao meu orientador

Prof. Dr. Antonio Carlos Palandri Chagas
pela coragem de percorrer novos caminhos,
sempre na busca de respostas,
munido de arrojada visão científica,
despreendimento
e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Protásio Lemos da Luz, meus sinceros agradecimentos pelo constante apoio e minha profunda admiração pelo médico, pelo cientista e pelo que representa para a cardiologia.

Aos Profs. Drs. Francisco Laurindo, Raul Maranhão e Carlos Eduardo Negrão que me forneceram todo incentivo e suporte.

Às Prof.^{as} D.^{ras} Maria Cecília Solimene, Silmara Coimbra, Maria Urbana, Ivani Trombetta; às D.^{ras} Eliana Cerqueira, Nilcéia Lopes da Silva e Celise Denardi; aos Profs Drs. Desidério Favarato, Sergio de Oliveira e Fernando Cesena que além de todo auxílio me deram algo muito valioso: amizade.

Aos Profs. Drs. Eduardo Moacyr Krieger, meu sempre mestre, e José Carlos Manço, às Prof.^{as} D.^{ras} Fernanda Consolim e Ana Paula Chacra, pelos preciosos conselhos nos momentos exatos.

À Silvia Furtado e Fabiana Lima, por toda amizade e apoio na secretaria da Unidade Clínica de Aterosclerose.

À Neusa Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva de Oliveira da Comissão de Pós Graduação do InCor pelo auxílio e carinho que sempre me proporcionaram.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Vascular, do Laboratório de Lípidos; do Laboratório de Reabilitação e do Setor Experimental pela constante ajuda.

À Ana, Ângela, Clementina, Ricardo, Eduardo e à toda equipe de Documentação Científica pela simpatia e presteza em todos os momentos.

A todos os funcionários do InCor, pois sempre me fizeram sentir muito bem-vindo.

Aos meus mais que amigos, meus irmãos, Humberto Isaac e Marcelo Zanardi, que sempre me incentivaram e me apoiaram incondicionalmente em todas as circunstâncias.

À Ângela, Miguel e todos do Ambulatório Regional de Especialidades de Ribeirão Preto, sem os quais eu não teria iniciado este projeto.

Ao excelente Centro de Saúde Escola do Butantã na cidade de São Paulo, principalmente nas pessoas do Dr. Rubens Kon e das enfermeiras Ana Emilia e Carine, que tanto me auxiliaram.

Aos meus irmãos de coração Lourdes Antonio e Célia, Elci, Celina, Hilda, Graciema e Chicão Bernardes, por todo amor, carinho, apoio e preces.

Meu agradecimento especial à Laura Ventura, Vanda Yoshida e Marisa Góes, pessoas maravilhosas, fundamentais na realização deste estudo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo valioso apoio financeiro, sem o qual esta pesquisa não se realizaria.

Finalmente, meus sinceros agradecimentos a todos os meus pacientes participantes desta pesquisa, que sempre foram os meus maiores incentivadores.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Abreviaturas, Sinais e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Endotélio	2
1.2 Síndrome metabólica.....	4
1.3 Características das lipoproteínas na síndrome metabólica	7
1.4 Exercício físico.	17
1.5 Justificativa	22
1.6 Objetivos	23
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	24
2.1 Participantes e critérios de inclusão/exclusão	25
2.2 Metodologia.....	27
2.3 Protocolo de treinamento físico	29
2.4 Reatividade vascular	32
2.5 Metodologia das análises laboratoriais.....	38
2.5 Separação e análises funcionais das lipoproteínas.....	42
2.6 Análise estatística.....	56
3. RESULTADOS.....	57
4. DISCUSSÃO.....	87
5. CONCLUSÃO.....	99
6. ANEXOS.....	101
7. REFERÊNCIAS	108

ABREVIATURAS, SINAIS E SIGLAS

♀ e ♂	Mulher e Homem
AGL -	Ácidos graxos livres
Apo-A1 -	Apoproteína A1
Apo-B -	Apoproteína B
CE -	Colesterol Esterificado
CETP -	Proteína de transferência do éster de colesterol
CL -	Colesterol Livre
CT -	Colesterol Total
Cu SO ₄ -	Sulfato de Cobre
DP -	Desvio Padrão
EROS -	Espécies Reativas de Oxigênio
FC -	Frequência Cardíaca
HDL -	Lipoproteína de Alta Densidade
HL -	Lipase hepática
HR -	Hiperemia Reativa
ICAM -	Molécula de adesão intercelular
IL-6 -	Interleucina-6
IMC -	Índice de Massa Corpórea
K ₃ -EDTA -	Ácido tetra acético etileno diamino tripotássico
LA -	Limiar anaeróbio
LCAT -	Lecitina:Colesterol Aciltransferase
LDL -	Lipoproteína de Baixa Densidade

LDLox -	Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada
mmHg –	Milímetro de mercúrio
NO –	óxido nítrico
NT -	Nitrato sublingual
PA –	Pressão Arterial
PAF-AH -	Fator de ativação Plaquetário- acetilhidrolase
PAI-1 -	Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1
PBS -	Solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH entre 7,4 e 7,6
PCR –	Ponto de Compensação Respiratória
PCRus –	Proteína C Reativa ultra sensível
PL –	Fosfolípidos
PON –	Paraoxonase
PT –	Proteína Total
QM –	Quilomicrons
SMet –	Síndrome Metabólica
TBARS –	Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TF -	Treinamento Físico
TNF- α -	Fator de necrose tecidual alfa
VCAM –	Molécula de adesão vascular
VE -	Ventilação pulmonar
VLDL –	Lipoproteína de muito baixa densidade
VO2 pico ou VO2 max -	Consumo de oxigênio obtido no pico do exercício
Vs –	versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transporte reverso de colesterol	1
Figura 2 - Ligação de HDL ao receptor <i>Scavenger</i> -BI (SR-BI) ativando a enzima eNOSintase	21
Figura 3 - Teste de ergoespirometria e Programa de Treinamento Físico	31
Figura 4 - Paciente com manguito e transdutor posicionados para realização do exame de reatividade vascular	33
Figura 5 - Variação de diâmetro da artéria braquial após a hiperemia reativa	35
Figura 6 - Fluxo na artéria braquial em repouso e após hiperemia reativa	35
Figura 7 - Avaliação computadorizada do diâmetro da artéria braquial	37
Figura 8 - Preparação dos gradientes para separação das lipoproteínas por Ultracentrifugação	46
Figura 9 - Separação das Subfrações de LDL e HDL	47
Figura 10 - Classificação das Subfrações de LDL e HDL	48
Figura 11 - Exemplo da influência da HDL na oxidação <i>in vitro</i> da LDL	56
Figura 12 - Variação do VO ₂ máximo alcançados por pacientes SMet que realizaram TF e participantes Normais de Controle	64
Figura 13 - Valores de concentração de apoB, apoA1 e relação apoB/apoA de pacientes com SMet antes e após TF	75
Figura 14 - Valores de concentração de PCRus de pacientes com SMet ANTES e APÓS TF e de Normais controle.....	76
Figura 15 - Reatividade Vascular Endotélio Dependente e Independente de Pacientes com SMet Antes e Depois do TF.....	77

Figura 16 - Aumento do Nitrito no Sangue Total dos pacientes SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF	78
Figura 17 - Porcentagem da alteração do Tempo de Retardo à Oxidação do LDL nos pacientes SME-TF Antes e Depois do TF.....	79
Figura 18 - Concentração de TBARS plasmáticos	80
Figura 19 - Diâmetro das partículas de HDL	82
Figura 20 - Influência das subfrações de HDL no Retardo à Oxidação <i>in vitro</i> da LDL dos Pacientes com SMet Antes e Depois do TF.....	85
Figura 21 - Atividade da PON-1	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Medidas Gerais dos Pacientes com SMet.....	59
Tabela 2	-	Medidas gerais dos participantes normais - controle.....	60
Tabela 3	-	Valores de VO ₂ pico (mL.kg-1.min-1) obtidos no teste ergoespirométrico dos Pacientes com SMet-TF Antes (A) e Depois(D) do TF	62
Tabela 4	-	Valores de VO ₂ pico (mL.kg-1.min-1) obtidos no Teste Ergoespirométrico dos Participantes Nomais-Controle.....	63
Tabela 5	-	Valores de VO ₂ pico (mL.kg-1.min-1) obtidos no Teste Ergoespirométrico dos pacientes com SMet-Controle Início(I) e Final (F) dos 4 meses de acompanhamento.....	65
Tabela 6	-	Medidas dos Pacientes com SMet Antes(A) e Depois(D) do TF	66
Tabela 7	-	Medidas dos Pacientes com SMet-Controle sem TF no Início (I) e Final (F) de 4 meses de acompanhamento.....	67
Tabela 8	-	Medidas de Bioimpedância dos Pacientes com SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF	69
Tabela 9	-	Medidas de Bioimpedância dos Pacientes com SMet-Controle Início (I) e Final (F) dos 4 meses de acompanhamento.....	70
Tabela 10	-	Medidas de Bioimpedância dos participantes Normais - Controle.....	71
Tabela 11	-	Resultados Bioquímicos dos Pacientes com SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF	72
Tabela 12	-	Dados Bioquímicos dos Pacientes com SMet-Controle - Intervalo de 4 meses sem TF	74
Tabela 13	-	Alteração percentual da composição do LDL dos Pacientes com SMet-TF Antes e Depois do TF	81

Tabela 14 - Diferença percentual da composição das subfrações de HDL de pacientes com SMet antes(A) e depois(D) TF	83
Tabela 15 - Comparação do percentual de Transferência Lipídica para a partícula HDL de pacientes SMet antes(A) e depois(D) TF com Controles(C).....	83

RESUMO

Casella Filho A. *Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com síndrome metabólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 129 p.

A disfunção endotelial é um dos componentes básicos tanto da origem como das complicações de algumas doenças cardiovasculares principalmente aquelas devidas à aterosclerose. Fatores de risco que compõe a Síndrome Metabólica (SMet) interferem na integridade endotelial por causarem marcante estresse oxidativo e conseqüente disfunção endotelial. Os benefícios de um treinamento físico de longa duração sobre o endotélio e sobre a concentração das lipoproteínas já são conhecidos. Entretanto, ainda restam lacunas de conhecimento dos efeitos que um treinamento de curta duração produziria em pacientes portadores de Síndrome Metabólica. Para elucidarmos este assunto estudamos 40 indivíduos sedentários sendo 30 portadores de SMet e 10 normais para controle. Vinte dos pacientes com SMet (10 mulheres e 10 homens) realizaram treinamento físico (TF) aeróbio de moderada intensidade, em bicicleta ergométrica, por um período de 3 meses. A reatividade vascular e testes funcionais *in vitro* das lipoproteínas HDL e LDL foram realizados antes e depois do TF. Os resultados indicam melhora na função endotelial, porém sem mudanças do índice de massa corpórea e dos níveis lipídicos. Houve redução da circunferência abdominal e dos níveis de Triglicérides. Os testes funcionais revelaram que, apesar de não ter ocorrido alterações na concentração, houve melhora funcional das lipoproteínas. Portanto, exercício de curta duração melhora a funcionabilidade endotelial e das lipoproteínas.

Descritores: 1 - Síndrome Metabólica X 2 - Lipoproteínas 3 - Endotélio/ultra-sonografia 4 - Exercício

SUMMARY

Casella Filho A. *Role of exercise in lipoproteins and in the endothelium of patients with metabolic syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 129 p.

Endothelial dysfunction is one of the basic components of origin and complications of some cardiovascular diseases, especially those consequent to atherosclerosis. Risk factors that compose the Metabolic Syndrome (MetS) modify the endothelial integrity causing significant oxidative stress and consequent endothelial dysfunction. The long-term exercise training benefits in lipoproteins concentration and endothelium are already known. However, the effects of short-term training in endothelial function and in LDL, HDL quantitative and functional profile are still doubtful, especially in patients with MetS. To address this issue, we studied 40 sedentary persons, 30 with MetS and 10 controls. Twenty of those with MetS (10 women and 10 men) were subjected to a 3 times/week moderate intensity controlled training load for 3 months on a bicycle ergometer. Vascular reactivity and *in vitro* HDL, LDL functional laboratorial tests were analyzed before and after the training. The results revealed that exercise training improved the endothelial function. There was no significant change in body mass index, but some reduction in the abdominal circumference was observed. Total cholesterol and lipoprotein concentrations were not affected by exercise, but triglyceride levels were reduced and lipoprotein subfractions functional tests significantly improved. Therefore, short-term exercise improves endothelium and lipoprotein functionality.

Descriptors: 1.Metabolic syndrome X 2.Lipoproteins
3.Endothelium/ultrasonography 4.Exercise

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENDOTÉLIO

O endotélio era considerado como uma simples barreira cujas funções eram de permitir a difusão de substâncias e separar o sangue do músculo liso vascular, sendo que atribuía o controle da reatividade vascular da musculatura lisa subjacente ao sistema nervoso simpático e aos hormônios vasoativos circulantes.

Entretanto, descobriu-se que as células endoteliais possuem na realidade muitas ações autócrinas e parácrinas, produzindo e liberando óxido nítrico (NO), fator fundamental na modulação do tônus vascular.¹ O endotélio passou então a ser reconhecido como um tecido extremamente sofisticado, responsável entre outros pela modulação contínua e refinada da irrigação sanguínea, mantendo assim a homeostase vascular.

Ao percorrer os vasos o fluxo sanguíneo exerce pressão sobre a camada endotelial ocasionando uma série de reações intracelulares que levam à produção de substâncias com propriedades fundamentalmente vasodilatadoras, entre elas a Prostaciclina, bem como outras com propriedades vasoconstritivas como a Angiotensina II e a Endotelina. A modulação promovida pelo endotélio íntegro e sadio promove no tônus vascular apresenta características francamente vasodilatadoras.

É importante ressaltar que as células endoteliais são as responsáveis pela produção de várias substâncias que causam vasodilatação assim como outras com efeitos antioxidantes, antiinflamatórios, antitrombóticos. A perda destas características contribui para o processo aterogênico.²

Disfunção Endotelial

Algumas situações orgânicas adversas são capazes de alterar o refinado equilíbrio homeostático vascular por provocar uma alteração na função endotelial. Este desequilíbrio leva a uma modificação do estado normal de vasodilatação endotélio-dependente a nível celular, caracterizado pelo predomínio dos efeitos vasoconstritores sobre os efeitos vasodilatadores, quase sempre resultante de uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), e ocorre principalmente na presença fatores de risco tradicionais para o aparecimento de doenças cardiovasculares.^{3,4}

Alguns destes fatores podem potencializar o processo de aterosclerose como a Hipertensão Arterial, o Diabetes Mellitus, a Dislipidemia e principalmente a Obesidade Abdominal. Numerosos dados epidemiológicos evidenciam o quanto estes fatores são importantes isoladamente e, principalmente, como são sinérgicos entre si. Ao agrupamento de alguns destes fatores denomina-se atualmente de Síndrome Metabólica (SMet).^{5,6}

1.2 SÍNDROME METABÓLICA

A Síndrome Metabólica é classificada como um conjunto de fatores de risco que ocorrem em maior grau que o esperado⁷ e que se relacionam intimamente com o processo de disfunção endotelial. Os parâmetros para o diagnóstico clínico propostos pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM)⁸, consoante com o *National Cholesterol Education Program* (NCEP-ATP III-2001)⁹ assim como pela *American Heart Association* (AHA)¹⁰ consistem na combinação de pelo menos 3 dos seguintes achados:

- presença de obesidade viscerο-abdominal estimada pela circunferência da cintura abdominal

Homens : circunferência abdominal ≥ 102 centímetros

Mulheres: circunferência abdominal ≥ 88 centímetros

- aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides > 150 mg/dL
- diminuição dos níveis plasmáticos de HDL

Homens : HDL < 40 mg/dL*

Mulheres: HDL < 50 mg/dL *

- hipertensão arterial com PA sistólica ≥ 130 mmHg e diastólica ≥ 85 mmHg *
- glicemia ≥ 110 mg/dL *

* (ou já em tratamento)

Por existirem diferenças de características étnicas a *International Diabetes Federation* – IDF¹¹ propôs a obesidade abdominal como ponto central do diagnóstico com valores diferenciados de medida de circunferência da cintura segundo a etnia caucasóide, asiática não-japonesa e japonesa, como a seguir:

- Obesidade abdominal, avaliada pela medida da circunferência abdominal:

Homens: Caucasianos (americanos)>102cm, europeus>94cm, asiáticos não japoneses>90cm e japoneses>85cm.

Mulheres: Caucasianas (americanas)>88cm, europeias>80cm, asiáticas não japonesas>80cm e japonesas>90cm.

Acrescido de mais ao menos dois dos outros parâmetros listados anteriormente

Relações entre Obesidade Visceral, Disfunção Endotelial e Aterosclerose na Síndrome Metabólica

Dentre os componentes da SMet, a obesidade visceral é a mais associada com múltiplos fatores de risco cardiometabólico como a dislipidemia aterogênica, a disglícemia assim como pela sua relação com a disfunção endotelial e o processo aterosclerótico, responsáveis finais por doenças de alta mortalidade como infarto do miocárdio e acidentes vasculocerebrais.¹²

O tecido adiposo da região intra-abdominal, mais que um simples depósito de gordura e energia, é na realidade palco de intenso processo dinâmico de lipólise/lipogênese. Comporta-se como um órgão endócrino produtor de uma série de substâncias nocivas ao endotélio como o fator de necrose tecidual alfa (TNF- α), a Interleucina-6 (IL-6), a Resistina, a Leptina e o Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1 (PAI-1), todos com importantes influências sobre o endotélio e sua funcionabilidade.³

Nos grandes depósitos de gordura intra-abdominal ocorre uma liberação excessiva de ácidos graxos livres (AGL) que são intimamente relacionados com o processo de resistência celular à ação da insulina, tanto nas células da musculatura esquelética como nas do fígado. A resistência à insulina encontra-se associada a um aumento da atividade da lipase hepática (HL) que é a responsável pela hidrólise de triglicérides e fosfolípidos componentes das partículas lipoprotéicas de LDL e de HDL. Esta hidrólise resulta numa conversão das partículas grandes e leves da LDL para partículas menores e mais densas, provocando uma dislipidemia com características fortemente aterogênicas.^{14,15}

Dislipidemia na Síndrome Metabólica

A dislipidemia que geralmente acompanha a SMet é chamada de “tríade lipídica aterogênica”, que é composta de níveis elevados de triglicérides séricos, níveis baixos de HDL e presença de LDL constituída preponderantemente por partículas pequenas e densas. Esta disposição

múltipla de anormalidades lipídicas constitui, sem dúvida, fator de risco poderoso para o processo aterosclerótico.^{16,17}

1.3 CARACTERÍSTICAS DAS LIPOPROTEÍNAS NA SÍNDROME METABÓLICA

Numerosos estudos mostram que níveis sanguíneos elevados de colesterol, contido principalmente nas partículas de LDL, são fatores determinantes para início e progressão da aterosclerose.^{18,19,20}

Na SMet entretanto, os níveis de colesterol total assim como de LDL podem se encontrar quantitativamente muito próximos de parâmetros superponíveis pelas várias diretrizes. Porém, os portadores de SMet possuem para um mesmo valor de colesterol plasmático uma maior quantidade de partículas de LDL.²¹ Isto ocorre porque as partículas de LDL na realidade não são uniformes constituindo-se em várias subfrações que podem ser classificadas, de acordo com seu tamanho e densidade, em LDL grandes e flutuantes (densidade entre 1.025 - 1.034 g/ml), LDL intermediárias (densidade entre 1.034 - 1.044 g/ml) e as LDL pequenas e densas (densidade entre 1.044 - 1.060).²²

As alterações metabólicas envolvidas na SMet são responsáveis pela maior incidência de partículas menores e mais densas de LDL estabelecendo uma forte ligação entre este tipo de lipoproteína com disfunção endotelial e conseqüente doença aterosclerótica.²³

Na realidade, as partículas LDL pequenas e densas são mais aterogênicas por várias razões. Primeiramente, por serem estruturalmente alteradas devido a mudanças na sua conformação espacial, possuem baixa afinidade com os seus receptores hepáticos, ocorrendo grande prejuízo no seu clareamento plasmático e por isto permanecem mais tempo na circulação.²¹ Pelo seu menor tamanho, penetram com maior facilidade na parede dos vasos^{24, 25} e a sua estrutura peculiar as torna mais suscetíveis à oxidação pelas chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS) no ambiente subendotelial que as transformam em LDL oxidadas (LDLox)^{26,27} Estas alterações estruturais das partículas também propiciam sua ligação a proteoglicanos presentes na íntima vascular, o que as retém dentro da parede do vaso agravando mais ainda sua transformação oxidativa.²⁸

Na atualidade sabemos que a LDLox é um potente indutor da aterogênese por estimular as células endoteliais a produzirem moléculas pró-inflamatórias (moléculas de adesão e fatores de crescimento), resultando no recrutamento dos monócitos para a parede do vaso e iniciando o processo aterosclerótico.²⁹

A suscetibilidade da LDL à oxidação é bastante influenciada pelo ambiente em torno da partícula, incluindo concentrações locais de antioxidantes, pH e principalmente pela presença de HDL e das suas enzimas associadas como a paraoxonase 1 (PON1), paraoxonase-3 (PON3), Fator de ativação Plaquetário- acetilhidrolase (PAF-AH) e LCAT, que possuem habilidade de proteger a LDL da oxidação impedindo a geração de hidroperóxidos dos fosfolipídios das partículas de LDL.^{30, 31}

As partículas de HDL entretanto, que são muito importantes na proteção à oxidação da LDL entre outras ações, encontram-se geralmente em baixas concentrações sanguíneas na SMet. Os mecanismos relacionados com este baixo nível sanguíneo de HDL não está bem estabelecido porém existem evidencias que a hipertrigliceridemia, relacionada com o intenso processo de lipólise/lipogênese da gordura visceral, que geralmente acompanha estes casos, pode ser importante neste processo. Existem evidências que sugerem que os mecanismos preliminares que conduzem aos níveis reduzidos de HDL plasmático assim como da própria partícula de HDL em estados hipertrigliceridêmicos podem ser devido a qualquer um ou à combinação das seguintes possibilidades:

1- as partículas pequenas de HDL, que são um produto da lipólise de partículas de HDL enriquecidas de triglicérides, podem ser clareadas mais rapidamente da circulação,

2-As partículas enriquecidas de triglicérides das HDL podem ser mais instáveis na circulação porque suas apoproteínas ficam mais frouxamente aderidas, especialmente a apo A-I.

3-A lipase lipoproteica disfuncional, ou com atividade reduzida, pode contribuir para reduzir os níveis de HDL diminuindo a disponibilidade dos constituintes de superfície das lipoproteínas enriquecidas de triglicérides, extremamente necessários para a formação de partículas nascentes de HDL.

De uma forma geral as partículas de HDL são bastante heterogêneas, apresentando apoproteínas aderidas na sua capa externa, principalmente da apoproteína A-I, sozinha ou acompanhada da apoproteína A-II, além de um

grande número de outros constituintes menores, todos funcionalmente muito atuantes.

A HDL pode ser classificada de acordo com seu tamanho e densidade em HDL₂, maiores e mais leves e HDL₃, menores e mais densas. A fração HDL₂ é na realidade constituída das subfrações HDL_{2a} e HDL_{2b} e, a fração HDL₃, nas subfrações HDL_{3a}, HDL_{3b} e HDL_{3c}, podendo ser isoladas pelas diferentes densidades que se apresentam por ultra centrifugação. Estas subfrações por sua vez são constituídas de várias subpopulações de partículas com tamanho, densidade e composição bem variadas. Estudos realizados com eletroforese de poliacrilamida com gradientes escalonados mostraram a existência de um número superior a uma dezena de subfrações de HDL³² Esta heterogeneidade provavelmente é causada por contínuas mudanças entre estas subpopulações, influenciadas por vários fatores plasmáticos. Uma das conseqüências disto é que as subpopulações de HDL são muito diversas estruturalmente, podendo conferir então uma ampla variedade de aspectos funcionais das partículas.^{33, 34} Isto pode ser inferido por estudos em animais transgênicos onde as diversas subpopulações de HDL podem variar em sua habilidade de proteção contra o processo aterosclerótico.^{35,36,37}

As partículas de HDL carregam muitas propriedades potencialmente antiaterogênicas, através de diferentes mecanismos, distribuídas entre suas subfrações, sendo que as propriedades mais importantes atualmente conhecidas e experimentalmente verificadas são: Mediação do Transporte

Reverso do Colesterol, Inibição da Oxidação do LDL, Ação Antiinflamatória na parede vascular e Ação AntiApoptótica.^{36, 39}

HDL e o Transporte Reverso do Colesterol

As partículas de HDL originam-se de vários locais no organismo sendo que o intestino é responsável por 30% do total das HDL contidas na circulação.⁴⁰ Entretanto, a maior parte da produção de apolipoproteínas A-I, constituintes fundamentais das partículas nascentes de HDL, é proveniente do fígado. A enzima lipoproteína lípase por sua vez, agindo nas VLDL e nos quilomicrons (QM), faz com que se desprendam componentes de superfície destas lipoproteínas, como colesterol livre, fosfolípidos e apolipoproteínas, dando origem a estruturas lamelares denominadas pré-beta HDL, que são as partículas nascentes de HDL, responsáveis pela remoção do excesso de colesterol das células periféricas através das membranas celulares. Esta remoção do colesterol das células pelas pré-beta HDL, ou apolipoproteínas A-I dissociadas, ocorre graças à interação com os receptores de membrana ABC A-1 (*ATP binding cassette transporter A-1*) e SR-BI (*Scavenger Receptor class B type I*). Outro membro da família ABC, o ABC G1 (*ATP binding cassette transporter G-1*), parece também estar envolvido no efluxo do HDL maduro, porém não nos pobres em lipídios.³⁸

Após a captação do colesterol este é esterificado pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) localizada na superfície das HDL, convertido em éster de colesteril, e continuamente vai preenchendo o núcleo da partícula de HDL nascente que começa então a tomar o formato

esferoidal transformando-se na partícula HDL₃. À continuação do processo, pela ação da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), existe uma captação de triglicérides, advindos das lipoproteínas que contêm apolipoproteína B como as QM, VLDL e LDL, transformando as HDL ainda maiores e globulares, sendo então designadas de HDL₂. A CETP portanto é a grande responsável pelas trocas de colesterol esterificado por triglicérides entre HDL e VLDL-LDL.

As HDL₂, ricas em triglicérides, são metabolizadas pela lipoproteína lipase hepática o que favorece a subsequente remoção seletiva do colesterol esterificado de seu núcleo, pelos receptores SR-BI. Os componentes remanescentes das HDL, principalmente, apolipoproteínas, retornam ao interstício, reiniciando o ciclo de retirada de colesterol celular. A este processo chamamos de transporte reverso de colesterol, responsável pela remoção do colesterol da periferia para o fígado para ser eliminado na bile. (ver Figura 1).

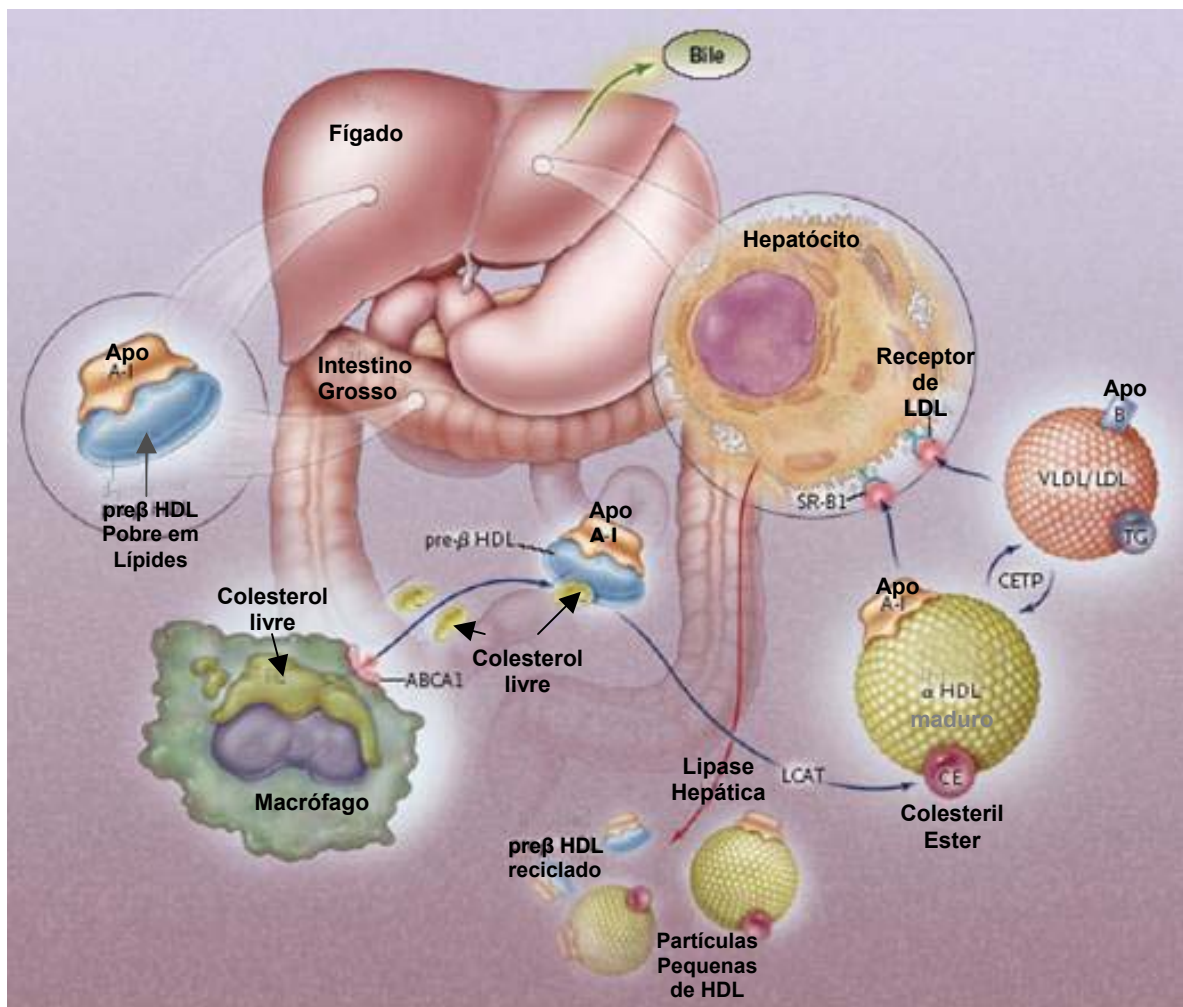


Figura 1 - Transporte reverso de colesterol - As pre-(beta) HDL, ricas em apolipoproteína A-I (apoA-I), são sintetizadas pelo fígado ou mucosa intestinal e liberadas para a circulação onde, promovendo a transferência do excesso de colesterol livre dos macrófagos, vão aumentando de tamanho e se transformando nas HDL₃ e 2. Estas são transportadas ao fígado onde são processadas.

Adaptado de Ashen M.D. e Blumenthal R.S. - N Engl J Med 2005;353:1252-60.

A capacidade das partículas de HDL de efluir o colesterol da LDL dos tecidos periféricos e transportá-lo ao fígado parece ter uma relação íntima com as características intrínsecas de suas subfrações e apoproteínas conjugadas. A interconversão das diferentes subpopulações, a favor da formação de grandes partículas de HDL que dirigem o colesterol ao fígado, é

inerente ao transporte reverso de colesterol e, embora a concentração total de HDL muitas vezes possa não variar, a distribuição de suas subfrações pode refletir eficiência ao longo deste transporte.^{41, 42, 43}

HDL e a Ação Antiinflamatória na parede vascular

O HDL possui propriedades antiinflamatórias entre as quais se encontra a inibição da expressão das moléculas de adesão na superfície das membranas celulares endoteliais (VCAM e ICAM), responsáveis pelo recrutamento monocitário plasmático para o interior da parede vascular. Em experimentos com culturas celulares o acréscimo de HDL no meio celular contendo LDL produz importante redução da transmigração monocitária. Entretanto, até o momento, não se conseguiu comprovar a participação da Apo-A1 neste processo.^{44, 45, 46}

HDL e a Inibição da Oxidação do LDL

A oxidação das biomoléculas de LDL no espaço subendotelial é considerada como um dos processos principais na aterogênese ocorrendo em vigência de situações de estresse oxidativo. As moléculas de LDL minimamente oxidadas (LDL-MM) são indutoras da produção de substâncias quimiotáticas aos monócitos circulantes, o que os estimula a um processo de adesão no leito vascular e interiorização no espaço subendotelial, onde se transformam em macrófagos. Estes macrófagos fagocitam partículas de LDL oxidado e se transformam em células espumosas, substratos fundamentais das placas ateroscleróticas subendoteliais.

Este processo pode ser atenuado ou suprimido pelo efeito antioxidativo da HDL sobre a LDL, inibindo parte do processo de oxidação subendotelial, através da atividade de enzimas associadas às suas apoproteínas as quais podem prevenir ou mesmo reverter este processo.⁴⁷ A paraoxonase 1 e 3 (PON1 e 3)⁴⁸, a glutathiona fosfolípide peroxidase, a PAF-AH e a LCAT são enzimas transportadas pela HDL responsáveis pela hidrólise dos produtos de oxidação da LDL⁴⁴ Associada com a Apo-A1 e a Apo-J, ambas apoproteínas da HDL, a PON 1 consegue entrar no espaço subendotelial tendo acesso aos locais de oxidação ou de acúmulo de LDL-oxidado na íntima vascular.^{51, 52, 53, 54}

A ação da PON é muito importante na hidrólise de fosfolípidos oxidados isolados das LDL-MM subendoteliais e outras enzimas também associadas às apoproteínas da HDL, como a LCAT e a PAF-AH, agem de forma complementar e seqüencial a ação hidrolítica da PON.^{49, 50}

Além de propriedades antioxidativas a PON parece ter a propriedade de inibir a biossíntese de colesterol e incrementar o efluxo de colesterol mediado pelo ABCA-1.⁴⁸

Recentemente, Kontush e colaboradores⁵⁵ demonstraram que a atividade antioxidante das subfrações do HDL é dependente da densidade de suas partículas sendo que as menores e mais densas possuíam maior poder antioxidante obedecendo a seguinte seqüência: HDL2b<HDL2a<HDL3a<HDL3b <HDL3c. Esta heterogeneidade de atividade antioxidante entre as subfrações provavelmente se deve à distribuição não

uniforme das apolipoproteínas e enzimas com propriedades antioxidantes associadas às partículas.⁵⁶

A potente atividade antioxidativa protetora observada nas menores e mais densas partículas provavelmente se deve ao sinergismo na inativação de lipídios oxidados por mecanismos enzimáticos (PON, LCAT e PAF-AH) e não enzimáticos, refletindo portanto propriedades físico-químicas intrínsecas.^{57, 58}

Estas variações funcionais entre as subfrações sugerem então que não é somente o aumento ou a redução da concentração da HDL que determina a proteção contra a doença aterosclerótica, mas também a concentração das subclasses da HDL, a mobilização celular de lipídios assim como a própria cinética do metabolismo da HDL.⁵⁹

A paraoxonase, em última análise, pode evitar a formação de células espumosas e atenuar o processo aterosclerótico por quatro diferentes mecanismos: 1) hidrólise de lípidos oxidados de macrófagos; 2) redução da oxidação da LDL mediada pelos macrófagos; 3) diminuição da concentração de LDL oxidada, pela hidrólise dos lípidos oxidados e 4) redução da captação de LDL oxidada pelos *receptores scavenger* de macrófagos, resultante da hidrólise de lípidos oxidados próximos à área do receptor.⁴⁸

Efeitos da Disglicemia sobre a HDL e LDL na Síndrome Metabólica

Em pacientes portadores de Síndrome Metabólica, com distúrbios no metabolismo glicêmico, foi observado que as biomoléculas de HDL podem perder ainda mais a sua eficiência funcional. Isto porque, além de uma composição anormal mais rica em triglicérides, podem sofrer uma glicação na sua estrutura apoproteica e ficar com uma capacidade diminuída tanto de induzir o efluxo do colesterol celular como em proteger a LDL de oxidação.

A Apoproteína B da LDL é também passível de glicação, o que torna a partícula menos eficiente para se ligar a seu receptor, reduzindo a sua depuração pelos hepatoreceptores, aumentando conseqüentemente sua meia vida plasmática, até conseguir ser removida por outras vias não receptoras-dependentes. Além disso, a partícula LDL glicada é mais sensível à oxidação, ponto central da aterogênese assim como da disfunção endotelial.^{60, 61, 62}

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico é uma das intervenções que representa um grande desafio ao organismo em relação à sua homeostase e, para a produção da energia necessária para sua manutenção, o organismo lança mão da utilização do fosfato de alta energia, o ATP, sendo que os substratos básicos

para sua formação são provenientes do metabolismo de Carboidratos, Triglicérides e Ácidos Graxos.

A atividade física pode aumentar o lipólise dos Triglicérides endógenos no tecido adiposo e no músculo esquelético⁶³ exercendo mudanças importantes no metabolismo das lipoproteínas.^{64, 65} Por melhorar a sensibilidade à insulina, como também por estimular diretamente a expressão e atividade da lipase, o exercício físico contribui para o catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides favorecendo a redução da trigliceridemia e da concentração de LDL pequenas e densas⁶⁶ embora poucos estudos tenham demonstrado alguma redução na concentração de LDL no plasma.⁶⁷

A maioria das pesquisas revela que o grande efeito benéfico dos exercícios aeróbios é reduzir a concentração de partículas ricas em triglicérides principalmente em pessoas que são pouco ativas e hipertrigliceridemicas, situação esta comum nos pacientes diabéticos ou com síndrome metabólica^{68, 69, 70, 71}

Não se sabe ainda muito bem como isto ocorre e uma das causas prováveis é que o exercício físico aeróbio promova aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica (LPL), que se encontra aderida às membranas das células endoteliais.^{72, 73}

O exercício físico, praticado de forma regular e por longos períodos além de diminuir a concentração plasmática de triglicérides pode levar a um aumento de até 15% nas frações de HDL, principalmente o HDL2,^{74, 75, 76} e pode promover alterações na concentração plasmática do Colesterol Total

principalmente quando ocorre uma redução do peso corporal e, portanto, gordura corporal.^{71, 79, 80}

É importante ressaltar que tanto a composição como a concentração das subpartículas de HDL são moduladas pela LCAT, pela proteína de transporte dos ésteres de colesterol (*Cholesterol Ester Transfer Protein-CETP*) assim como pelas enzimas lipolíticas como a Lipase Hepática (HL) e a Lipase Lipoprotéica, enzima esta envolvida na hidrólise dos triglicérides e que tem um aumento significativo após um período longo de treinamento físico.^{77, 78}

Em relação à concentração plasmática de LDL, pesquisas mostram que esta fração pode ser diminuída pelo treinamento aeróbio e que esta redução é muito mais efetiva quando o treinamento é associado à uma dieta balanceada.^{81, 82}

Em indivíduos normais sedentários, o exercício aeróbio realizado por longo período de tempo promove um aumento da HDL preponderantemente da subfração HDL2. Em diabéticos entretanto, curiosamente parece haver um aumento maior da subfração HDL3.⁷⁸ A elevação da concentração plasmática de HDL com o exercício, além do tempo de treinamento, parece também estar condicionado a diversos fatores tais como: resistência à insulina, peso corporal, trigliceridemia, sexo, idade, perfil lipídico prévio e polimorfismos genéticos de enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo das HDL.^{83, 84}

Influência do Exercício aeróbio sobre o Endotélio

Normalmente na circulação sanguínea a força de cisalhamento ou de arraste, o *shear stress*, que o fluxo exerce sobre a parede do vaso sanguíneo promove a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais desencadeando um processo de relaxamento da musculatura lisa vascular.

O mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio tem sido apontado como uma das principais adaptações vasculares proporcionadas pelo treinamento físico e parece estar relacionada a um aumento de óxido nítrico secundariamente ao aumento na expressão de óxido nítrico sintase (eNOS). Isto pode ser comprovado através de estudos em modelo animal onde se verificou que o exercício físico aumentava a expressão da eNOS, com conseqüente aumento na produção de óxido nítrico.

O óxido nítrico (NO) possui uma variedade de funções anti-aterogênicas e é essencial para a manutenção da saúde vascular. De fato, reduções da biodisponibilidade do NO estão ligados à alterações funcionais associadas com disfunção endotelial e aterogênese. Em decorrência da sua breve meia-vida torna-se difícil dosá-lo, entretanto produtos estáveis oriundos de reações com o NO podem servir como um índice da sua disponibilidade.⁸⁵

HDL e função endotelial

Recentemente mostrou-se que a ligação da HDL ao receptor *Scavenger-BI* (SR-BI) ativa a enzima eNOS sintase através da mobilização intracelular de Ca^{2+} e da fosforilação da eNOS, mediada pelo Akt,

promovendo liberação de Óxido Nítrico (NO) pelas células endoteliais. Os efeitos vasoativos parecem se relacionar com lisofosfolípidos carregados pela HDL e representam um aspecto interessante da função antiaterogênica destas biomoléculas.^{86, 87}

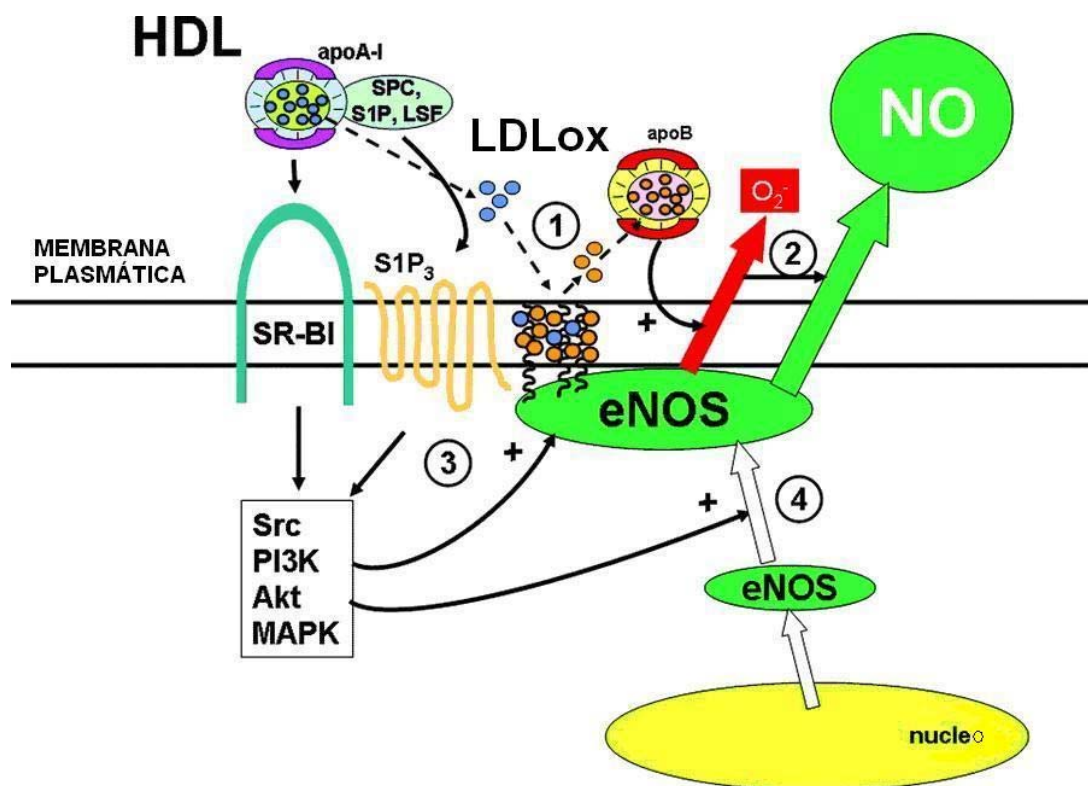


Figura 2 - Ligação de HDL ao receptor Scavenger-BI (SR-BI) ativando a enzima eNOSintase

Adaptado de Mineo C, *Circulation Research*. 2006; 98:1352

Comprovando clinicamente estes dados, Spieker et al⁸⁸ demonstraram que a infusão aguda de HDL reconstituído em indivíduos hipercolesterolêmicos era eficaz na melhora da disfunção endotelial, que

geralmente acompanha estes casos, por aumento da biodisponibilidade de NO, indicando a possibilidade de que a HDL possua efeitos endotélio-protetores por mecanismos de efeitos rápidos.

1.5 JUSTIFICATIVA

Muito se tem estudado sobre os benefícios que o exercício físico realizado por longo prazo traz ao endotélio e na concentração das lipoproteínas. Entretanto, pouco ainda se conhece sobre o que o exercício proporciona na qualidade destas partículas, pois talvez nem sempre mudanças de concentração podem estar acompanhadas de aumento de qualidade funcional.

Em pacientes portadores de SMet ainda existem importantes lacunas de conhecimento das modificações no endotélio e na concentração e/ou na qualidade funcional das lipoproteínas, principalmente com treinamento físico de curto prazo de tempo.

Este estudo, além de ampliar o conhecimento sobre a relação entre exercício físico, endotélio e as lipoproteínas, pode resultar em melhor compreensão dos mecanismos que envolvem o processo de aterogênese.

1.6 OBJETIVOS

- 1 - Analisar as alterações de concentração e de perfil funcional das lipoproteínas LDL e HDL, inclusive das suas subfrações, em pacientes portadores de Síndrome Metabólica após um curto programa de treinamento físico aeróbio individualizado.
- 2 - Analisar nestes pacientes as alterações da função endotelial que possam ocorrer com o programa de exercício implementado.

2 CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 PARTICIPANTES E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO/EXCLUSÃO

O estudo foi aberto, longitudinal, prospectivo e de intervenção tendo sido aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina USP – CAPPesq numero 547/05.

Foram estudados 40 indivíduos sedentários, 30 portadores de SMet e 10 normais para controle, selecionados após preencherem critérios de inclusão/exclusão pré-estabelecidos em relação à idade, doenças associadas e drogas em uso contínuo.

Todos os participantes foram acompanhados no Ambulatório de Aterosclerose do InCor assim como foram plenamente informados sobre o protocolo de estudo. Forneceram seu consentimento por escrito, de acordo com as normas do Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP, Instituto do Coração, somente após completo entendimento de todos os procedimentos que seriam abordados, os quais foram esclarecidos pormenorizadamente pelo pesquisador executante, que foi também quem fez o seguimento destes pacientes ambulatorialmente durante todo o período do programa.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO / EXCLUSÃO

Foram incluídos portadores de Síndrome Metabólica (de acordo com os critérios da NCEP-ATP III, I-DBSM, AHA)^{8, 9, 10} entre 21 e 70 anos, abstêmios ou consumidores leves de álcool (< 25 g/dia).

Todos se submeteram a Teste Ergoespirométrico sendo que aqueles que mostraram alterações isquêmicas foram excluídos.

Foram também excluídos portadores de doenças concomitantes como: Insuficiência Renal (Creatinina maior ou igual a 2 mg/dl), Insuficiência Hepática, Hipotireodismo, as doenças de fundo inflamatório e autoimunes (Lupus Eritematoso, Artrite Reumatóide, Asma Brônquica, etc...), pacientes em uso de estatinas e mulheres grávidas ou com suspeita de gravidez assim como em uso de anticoncepcional hormonal.

Também foram excluídos tabagistas, obesos com IMC>40 e pacientes em evolução de Infarto do Miocárdio ou de Angioplastia.

O uso de determinados fármacos de forma crônica como Vitaminas, Ginkgo Biloba e Ubiquinona, desde que não descontinuadas definitivamente até uma semana antes do programa, excluiu automaticamente o paciente.

Pacientes hipotensos (PA<90/60 mmHg), com bradicardia significativa (FC<40 bpm) ou com diâmetro da artéria braquial menor que 2,5 mm e maior que 5 mm também foram excluídos.

2.2 METODOLOGIA

Após a seleção, dos 30 pacientes com SMet, 20 realizaram Treinamento Físico (TF) por 3 meses. Os 10 restantes serviram de controle, como SMet sem exercícios, assim como os 10 participantes normais. Todos que concluíram o estudo mantiveram aderência e adaptação satisfatórias ao programa de TF, com um percentual de presença nos dias de treinamento acima de 75% do total estabelecido. Durante todo o período de estudo, não foram referidas queixas físicas que impossibilitassem a realização dos exercícios.

Todos tiveram uma avaliação clínica, antes e após o final do protocolo, assim como o registro de dados antropométricos como peso, altura, índice de massa corporal pelo cálculo $\text{peso}/\text{altura}^2$, percentual de água, massa magra e gordura corporal por bioimpedância, medidas da circunferência abdominal e da relação circunferência abdominal / circunferência quadril.

Todos realizaram Teste Ergoespirométrico, antes e depois do protocolo, que também serviu para análise da evolução do condicionamento físico dos pacientes com SMet que fizeram o TF.

Testes de Reatividade Vascular Braquial, constituídos de medidas do diâmetro arterial em resposta tanto a um fluxo sanguíneo aumentado como após uso de nitrato sublingual, foram feitos para estudo e análise da função endotelial de todos os participantes. Nos pacientes com SMet esta análise foi realizada antes e depois do protocolo.

As seguintes dosagens bioquímicas também foram feitas no início e fim do protocolo: Glicemia de jejum, Colesterol Total, HDL, Triglicérides, Ácido úrico, Proteína C Reativa ultra-sensível, Apoproteína A1 e Apoproteína B. Também foram realizadas as quantificações de TBARS plasmáticos e de Nitrito no sangue total.

Algumas amostras de soro e plasma serviram para análise das alterações nas características físicas e funcionais das lipoproteínas ao TF e, após separação das Lipoproteínas LDL e HDL (e suas subfrações) por processos de ultracentrifugação, foram realizados os seguintes testes antes e depois do TF:

1-Resistência das partículas de LDL dos participantes frente à oxidação *in vitro* por sulfato de cobre (Cu SO₄)

2-Transferência de Colesterol Livre, Triglicérides e Fosfolípidos marcados radioativamente, contidos numa emulsão artificial, para a HDL.

3-Influência das subfrações HDL2a e HDL3b sobre a resistência da LDL à oxidação *in vitro* por CuSO₄

2.3 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

TESTE ERGOESPIROMÉTRICO

Todos os participantes foram submetidos, antes do início e ao final do protocolo, a Teste Ergoespirométrico em cicloergômetro eletromagnético (Medfit). Foi utilizado o Protocolo de Esforço Progressivo de Rampa com incremento de carga, calculado pela carga máxima predita menos 10% e dividida por 10 minutos, mantendo-se velocidade de 60 rotações por minuto (rpm) até a exaustão para determinação da Frequência Cardíaca (FC) que serviu de referência no TF. Durante o teste de esforço, os pacientes foram monitorados por eletrocardiografia (eletrocardiógrafo CardioSoft), com 12 derivações simultâneas (conforme ECG de repouso).

A FC foi registrada em repouso, com o indivíduo posicionado no cicloergômetro, ao final de cada minuto do teste de esforço e nos 1^o, 2^o, 4^o e 6^o minutos do período de recuperação. A pressão arterial foi aferida em repouso nos 30 segundos finais a cada 2 estágios do exercício e nos 1^o, 2^o, 4^o e 6^o minutos do período de recuperação.

Simultaneamente ao teste de esforço, o participante foi conectado a um ergoespirômetro computadorizado (SensorMedics – Vmax Series modelo Vmax 229 Pulmonary Function/Cardiopulmonary Exercise Testing Instrument), por meio de um sistema de válvula e sensor, onde foram medidas a ventilação pulmonar (VE), as concentrações de O₂ e CO₂. A partir destas informações, foram determinados o VO₂ e a produção de CO₂.

Considera-se pico de VO₂ ou VO₂ máximo, o consumo de O₂ obtido no pico do exercício, quando o indivíduo não consegue mais manter a velocidade em 60 rotações por minuto.

Foram determinados os limiares ventilatórios a partir dos quais foi estabelecida a intensidade do TF. O Limiar Anaeróbio (LA) marca o limite entre a fase predominantemente aeróbia, a chamada fase I, e a fase quando se inicia a acidose metabólica compensada, chamada fase II.

O Ponto de Compensação Respiratória (PCR ou 2^o Limiar Ventilatório) define o predomínio do metabolismo anaeróbio, também chamada fase III, na qual a acidose metabólica é descompensada. Em indivíduos saudáveis o LA ocorre geralmente entre os 40 a 60% do VO₂ pico e o PCR entre 65 e 90% do VO₂ pico.⁸⁹

TREINAMENTO FÍSICO (TF)

Todo o programa de TF foi efetuado em bicicletas ergométricas na frequência de três sessões por semana com duração de 40 minutos cada sessão, além de 20 minutos divididos entre alongamento, exercícios localizados e relaxamento. Os exercícios foram realizados na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia Cardíaca do InCor sob supervisão contínua de profissionais especializados. Teve duração de 3 meses sendo que foi realizado, em média 3 semanas antes do início do programa de exercício físico, um treinamento sem ou com carga leve crescente nas bicicletas, porém numa intensidade abaixo do preconizado, que foi considerado como adaptação dos participantes ao exercício.

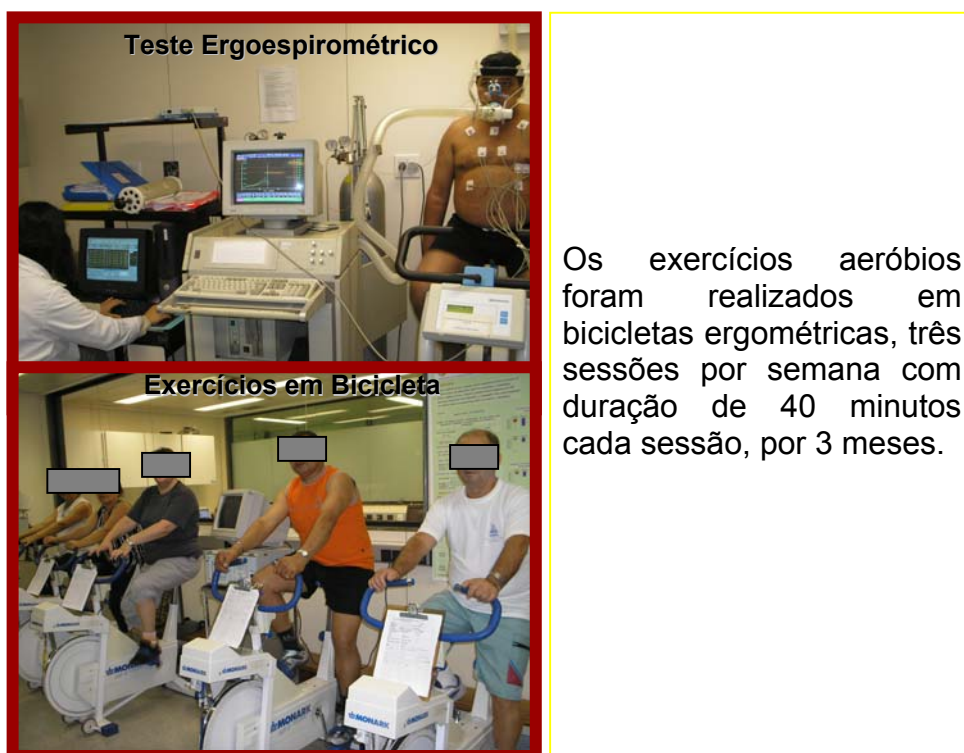


Figura 3 - Teste de ergoespirometria e Programa de Treinamento Físico

A intensidade alvo de Frequência Cardíaca preconizada para o treinamento foi obtida na faixa correspondente entre o Limiar Anaeróbio e até 10% abaixo do Ponto de Compensação Respiratório, esforço considerado de moderada intensidade, e foi a frequência de batimentos cardíacos que serviu de Controle do Esforço ou Zona de Trabalho ao qual se imprimiu durante as sessões de TF.

Os pacientes tiveram sua Pressão Arterial monitorada a cada 15 minutos no decorrer da atividade física sendo que o local de treinamento possuía temperatura controlada, cerca de 24 graus Celsius, e houve à disposição dos participantes: água, bebidas isotônicas e alimentos

carboidratados, como recomendado por Organizações Internacionais Especializadas.⁹⁰

2.4 REATIVIDADE VASCULAR

As mudanças do diâmetro da artéria braquial obtidos pelos testes de Reatividade Vascular Braquial, para o estudo e análise da função endotelial, foram avaliadas através de Eco-Doppler bidimensional de alta resolução (ATL modelo APOGEE 800 plus) equipado com transdutor linear 7,5MHz e por *software* para imagem bidimensional e *Doppler* acompanhado de monitorização eletrocardiográfica (ECG). Os exames ocorreram em ambiente com temperatura controlada variando de 20° a 25° C e todos os pacientes realizaram o exame em jejum de 12 horas. As medicações vasoativas foram suspensas 4 meias-vida anterior ao exame e os pacientes não realizaram nenhum exercício prévio.

Nas mulheres em fase reprodutiva a comparação das avaliações foi sempre na mesma fase do ciclo menstrual, ou seja, o exame foi realizado até o 5^o dia do início da menstruação por causa da possível interferência do nível estrogênico nos resultados.⁹¹

No laboratório os pacientes ficaram em posição supina por 15 minutos antes do início do exame e permaneceram nesta posição até o final. As medidas foram realizadas, em repouso, na seção longitudinal da artéria braquial esquerda acima da prega do cotovelo tanto durante hiperemia

reativa pós-compressão braquial (HR) como após administração de nitrato sublingual (NT) (Ver Figura 4). O *doppler* foi posicionado a 60° em relação ao centro do vaso e o aumento do fluxo foi induzido pela insuflação de um torniquete pneumático ao redor do braço até 250 mmHg, por 5 minutos, seguido de desinsuflação rápida do *cuff*, constituindo a HR.



Figura 4 - Paciente com manguito e transdutor posicionados para realização do exame de reatividade vascular

Após desinsuflar o *cuff*, foram monitorados os primeiros fluxos e o diâmetro da artéria por um período de 15 a 120 segundos sendo que o aumento de fluxo normalmente ocasiona dilatação da artéria braquial endotélio-dependente. (Ver Figuras 5 e 6)

Esta Dilatação Mediada pelo Fluxo (DMF) foi expressa na porcentagem de mudança do diâmetro da artéria braquial após estímulo em relação ao diâmetro basal, conforme fórmula:

$$\% \text{ DMF} = (\text{Diâmetro na hiperemia reativa} - \text{diâmetro basal}) \times 100 / \text{Diâmetro basal}$$

Não existe diferença na variabilidade do diâmetro em relação ao sexo e a variação de períodos longos entre as medidas não é significativa, permitindo assim que medidas feitas em intervalos de até meses possam ser comparadas.⁹²

O valor da DMF limite para função endotelial é maior que 10 % nas mulheres e 8% nos homens.

Para a avaliação da função endotélio-independente, foram analisados os diâmetros e fluxos da artéria braquial após administração de 5mg de nitrato sublingual, na mesma posição após repouso de 20 minutos da HR.

Considera-se normal uma dilatação acima de 10 %.

A fórmula para o cálculo da porcentagem de mudança no diâmetro após uso de nitrato:

$$\% \text{ dilatação artéria braquial após nitrato} = (\text{Diâmetro após nitrato} - \text{Diâmetro pré-nitrato}) \times 100 / \text{Diâmetro pré-nitrato}$$

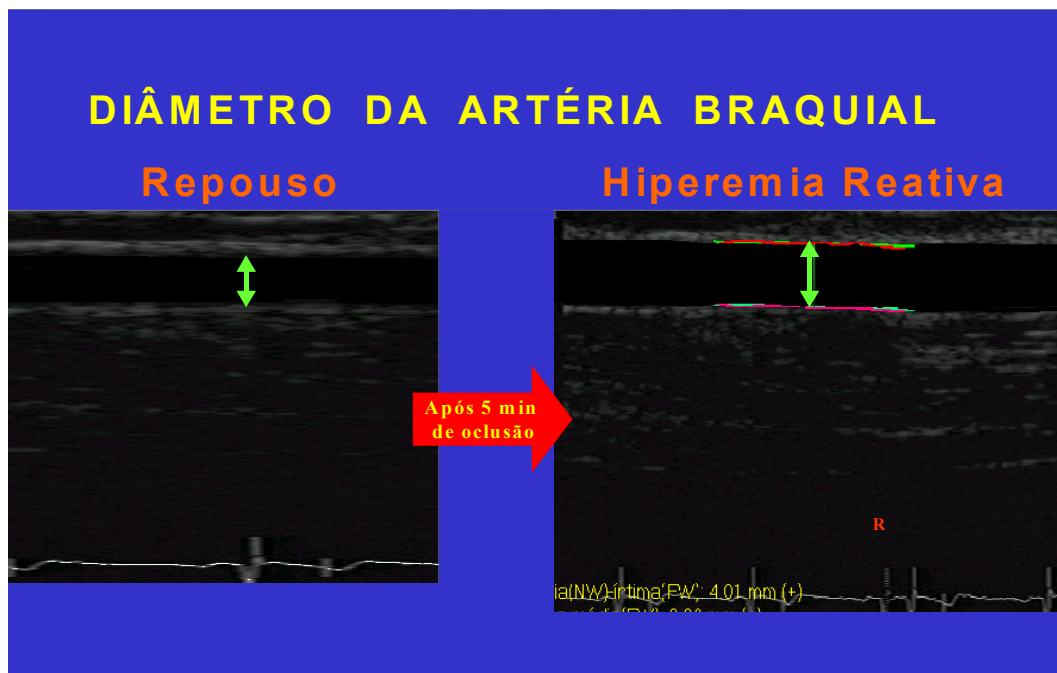


Figura 5 - Variação de diâmetro da artéria braquial após a hiperemia reativa



Figura 6 - Fluxo na artéria braquial em repouso e após hiperemia reativa

Os diâmetros e fluxos foram medidos diretamente da gravação em *videotape* VHS. A precisão da análise da reatividade da artéria braquial é altamente dependente das imagens ultrassonográficas. Atualmente mais de 1.500 exames já foram realizados pelo observador estando ele portanto apto à realização dos testes.

Aumento do fluxo da artéria braquial após hiperemia reativa

O diâmetro da artéria braquial foi medido no corte longitudinal com a visualização da luz-intima da parede anterior até a posterior. A análise da imagem foi realizada entre a média-adventícia da parede anterior até a posterior, por um *software* que permitiu medir um segmento da artéria e calcular a média, conforme demonstrado por Gutierrez et al.⁹³ As imagens foram adquiridas em 3 ciclos cardíacos e expressas em média, coincidente com a onda R do ECG (diâmetro mínimo). (Figura 7)

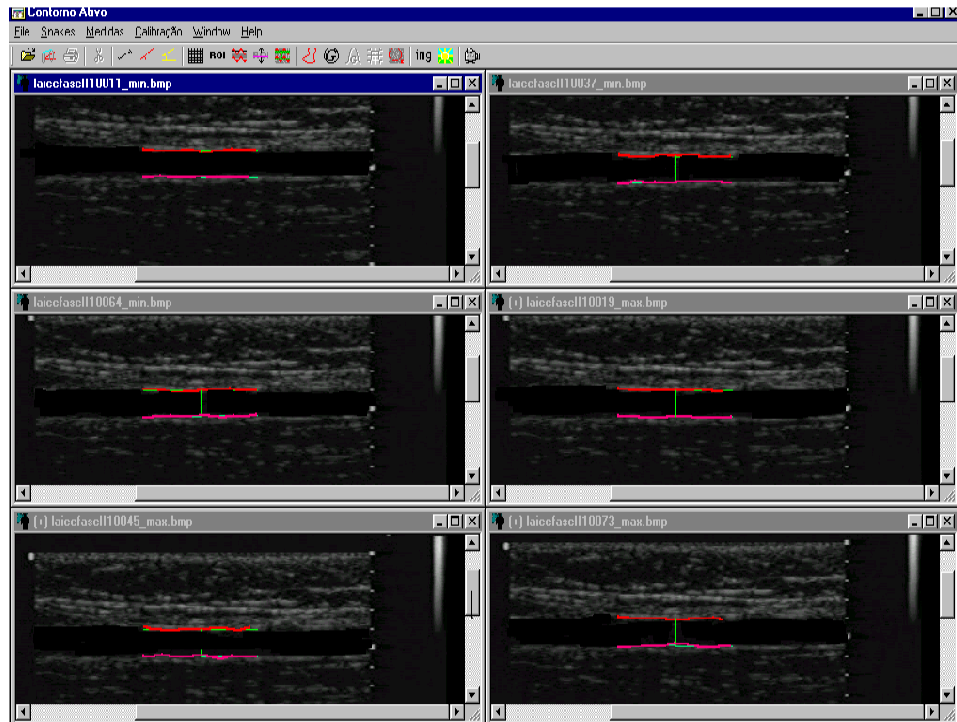


Figura 7 - Avaliação computadorizada do diâmetro da artéria braquial

A variabilidade entre medidas do diâmetro arterial foi de 2% entre dois observadores e de 1% intra-observador obtido neste laboratório em vários estudos.^{94, 95}

Estes dados estão de acordo com os critérios para assegurar a reprodutibilidade do método conforme o *Intersocietal Commission for the Accreditation of Vascular Laboratories e Guidelines for the Ultrasound*.⁹⁶

2.5 METODOLOGIA DAS ANÁLISES LABORATORIAIS

Coleta e Processamento das amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção da veia antecubital sempre pela manhã, após regime de jejum alimentar no mínimo de 12 horas e sempre no mesmo período do ciclo menstrual nas mulheres participantes e após no mínimo 16 horas da última sessão de exercícios.

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos estéreis a vácuo (*vacutainers*), contendo ou não ácido etileno-diamino-tetra-acético (K3-EDTA) na concentração final de 1,0 mg/dl. Após a coleta de sangue, o plasma e o soro foram imediatamente separados por centrifugação a 4°C. As amostras foram então estocadas sob congelamento a menos 80 °C até a sua utilização, porém somente após adição de Sucrose a 6% usado como crioprotetor da integridade estrutural e funcional das partículas lipoprotéicas em algumas das amostras.⁹⁷

O soro e as frações de lipoproteínas tiveram seu conteúdo de colesterol total e triglicérides dosados por métodos enzimáticos colorimétricos, por meio de sistema automatizado (COBAS MIRA, Roche Diagnostics - Mannheim, Alemanha) e por kits comerciais específicos (Labtest do Brasil, Minas Gerais, Brasil) assim como o colesterol livre e os fosfolípidos (Wako Pure Chemical, Osaka, Japão)

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry⁹⁸ e a Apo A-I e apo B foram determinadas por imunoturbidimetria (Wako Pure Chemical, Osaka, Japão). O colesterol da HDL foi medido após

precipitação das lipoproteínas que contêm apoB (VLDL e LDL), por meio de solução de sulfato de dextrana 1M / cloreto de magnésio 1M. (Labtest do Brasil, Minas Gerais, Brasil). A glicemia foi determinada logo após a coleta do sangue por kit enzimático colorimétrico (Labtest do Brasil, Minas Gerais, Brasil).

Atividade sérica da paraoxonase-1 (PON-1)

A atividade de PON-1, indicada pela hidrólise do substrato acetato de fenila, foi determinada pela incubação de acetato de fenila (1,0 mmol/L) com tampão Tris-HCl (20 mmol/L) contendo CaCl₂ (2,0 mmol/L), pH = 8,0.⁹⁹ O substrato foi adicionado ao tampão instantes antes do início da reação e a cinética aferida em cubetas, contendo 10 µL de soro aos quais foram adicionados 1,5 mL da mistura tampão/substrato.

As amostras foram lidas em duplicata e o branco constituído pelo tampão Tris-HCl/CaCl₂/acetato de fenila sem o soro com leituras feitas a cada 30 s, durante 3 min com comprimento de onda de 270 nm, a 25°C. A atividade foi apresentada em U/mL e representa a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de acetato de fenila. Exemplo $U / mL = (D \text{ abs.} / D t) * (1 / D) * (\text{vol. total} / \text{vol. amostra}) * 1000 * \text{diluição (40x)}$. D abs. / D t foi dado pela média de cada min e o tempo em min. O coeficiente de extinção molar (D) utilizado foi de 1310 M⁻¹.cm⁻¹.

A atividade da PON-1, inferida pela hidrólise de acetato de fenila, não sofre interferência dos polimorfismos da PON-1 e representa, em última análise, a atividade da massa da enzima (ng/ml/min).¹⁰⁰

Determinação das concentrações do nitrito

A metodologia a seguir foi utilizada para as determinações de nitritos e todos os testes foram realizados somente após o término do estudo para homogeneização dos resultados.

Para a determinação da concentração de nitrito, foram realizados os seguintes passos:

O sangue dos pacientes foi coletado em frasco heparinizado, livre de metais. Em menos de 30 segundos da coleta pipetou-se 1 ml em cada um de dois tubos tipo *ependorf* que continham: o primeiro, 0,2 ml de uma solução de 0,8 M de ferricianida (um agente oxidante) que é estabilizadora de nitritos e outro tubo que continha 0,2 ml da solução de ferricianida acrescido com 10 mM de N-etilmaleimida (NEM, um agente alquilante tiol) e 1% de NP-40 (agente citolítico que promove o acesso da ferrocianida e NEM ao conteúdo eritrocitário), na diluição 5:1 (sangue total:solução estabilizadora).¹⁰¹

Curva padrão para dosagem de nitritos

Para a montagem da curva de calibração para dosagem de produtos do NO (nitritos), preparou-se soluções padrão de Nitrito de Sódio nas seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,5 e 1 μM . Com uso do Analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA, fez-se as leituras de cada um dos padrões em triplicata. Também se realizou a dosagem do “branco” (água miliQ usada no preparo das soluções-padrão) correspondendo à Zero.

Quantificação de Nitrito

Amostras de 50 µl foram injetadas num frasco contendo uma solução redutora. O frasco é conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Hélio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador de NO. Este quantifica o NO liberado, que tem correspondência estequiométrica com a quantidade de nitritos presentes na amostra.^{102,103, 104}

Determinação da Peroxidação Lipídica (concentrações de Substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada por TBARS utilizando-se como padrão a curva de Malondialdeído (MDA), como anteriormente descrito.¹⁰⁵

Resumidamente :

Adiciona-se 2mL de ácido sulfúrico 0,04M em um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Retira-se 10µL de soro/plasma da amostra a ser analisada e transfere-se para o tubo de ensaio e se adiciona 250µL de ácido fosfotungstico a 10%, homogeneíza-se e aguarda a reação por 5 minutos. Centrifuga-se a 1600g por 10 minutos e se descarta o sobrenadante.

A seguir se adiciona 1mL de ácido sulfúrico a 0,04M e 150µL de ácido fosfotungstico a 10% ao sedimento, homogeneizando-se em seguida. Centrifuga-se a 1600g por 10 minutos e se descarta o sobrenadante, com cuidado para não descartar o sedimento. A seguir se adiciona 2mL de água destilada e 500µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% em cada tubo de ensaio. Agita-se.

Em banho-maria a 95°C por 1h o tubo é aquecido. *Obs. nesta fase, a tampa deve ser apenas levemente rosqueada.*

Resfriam-se os tubos à temperatura ambiente e se adiciona 2,5 mL de n-butanol agitando vigorosamente em vortex.

Após centrifugar a 1600g por 15 minutos, 200µL da fase superior da solução é retirado e transferido para uma placa de 96 poços.

Procede-se a leitura em fluorímetro previamente calibrado em excitação 515nm e emissão 553nm tudo em duplicata.

A fórmula para a quantidade de TBARS é como a seguir:

$$\text{TBARS (padrão malondialdeído)} = 0,5 \times f / F \times 1,0 / 0,02 = f / F \times 25$$

(nmol/mL de plasma)

Onde: F= absorbância do PADRÃO e f = absorbância da amostra

2.6 SEPARAÇÃO E ANÁLISES FUNCIONAIS DAS LIPOPROTEÍNAS

Separação das Lipoproteínas por Ultracentrifugação

Separação da LDL

A fração LDL foi obtida a partir de ultracentrifugação pelo método de separação por diferentes gradientes de densidade do plasma obtido de sangue colhido em tubos contendo K₃-EDTA (*Vacutainer*), de acordo com pequenas modificações de técnica anteriormente descrita.¹⁰⁶

Diálise das LDL

Antes de analisar as LDL do ponto de vista bioquímico e utilizá-las nos experimentos de oxidação *in vitro*, eliminou-se o brometo de potássio (KBr) e EDTA através de diálise em solução de PBS (pH 7,2) e Resina extratora (Chelex) durante 48h à 4°C, sob agitação. Trocou-se o banho de diálise a cada 08 horas para um máximo de 2 trocas. Após a diálise as subfrações de LDL foram recuperadas e conservadas a 4°C sendo analisadas no máximo em 07 dias.

Separação das subfrações HDL isoladas

Partículas de HDL foram separadas fracionadamente a partir do soro dos pacientes pelo processo de ultracentrifugação por gradiente de densidade (ultracentrifugação isopícnica) à 40.000 rpm, por 48 horas, à 15°C, como descrito previamente.¹⁰⁷ Resumidamente, as subfrações de HDL foram isoladas do soro para preservação da PON-1, por ser conhecido o efeito do EDTA como inibidor desta enzima, e congeladas a menos 80°C com sucrose a 6% até sua análise.

Após o descongelamento das amostras, foi preparado o gradiente de densidade, com quatro soluções de densidade previamente preparadas. As densidades das quatro soluções são: 1,006 g/ml; 1,019 g/ml; 1,063 g/ml; 1,21 g/ml e 1,24 g/ml.

São soluções obtidas com KBr sem adição de EDTA, conforme descrito a seguir:

O gradiente é preparado depositando-se em tubo Beckman *Ultraclear* (Beckman, USA) na seguinte ordem para cada soro analisado: 2 ml da solução 1,24 g/ml são depositados em primeiro lugar; seguindo de deposição lenta e cuidadosa de 3 ml de soro cuja a densidade é ajustada a 1,21 g/ml com KBr conforme a fórmula:

Ajuste da densidade do soro:

$$m = V (d_2 - d_1 / 1 - V d_2)$$

m= massa do sal utilizado

V= volume da solução

d1 e d2= densidades iniciais e finais da solução .

(Geralmente se utilizam 0,93 g de KBr em 3 ml de soro congelado com sucrose)

Ao final, as outras soluções com densidades de: 1,063 (2ml); 1,019 (2,5 ml) e 1,006 g/ml (2,5 ml) foram depositadas respectivamente com extremo cuidado e muito lentamente. A preparação das soluções de diferentes densidades foi realizada a partir de 2 soluções:

Solução A: com densidade de 1,006 g/ml feita com uso de cloreto de sódio (NaCl) 8,76 g; 625 µl de gentamicina (80 mg/ml)ajustando-se o pH7,4.

Solução B: com densidade de 1,357 g/ml feita com NaCl 153 g; KBr 354g; gentamicina 625 µl (80 mg/ml),ajustando-se para o pH 7,4.

Aplicando-se a fórmula $[dX (VA+VS) = (VA*dA) + (VS*dS)]$, onde: dX representa a densidade da solução desejada; escolhe-se um volume (VA) da solução A, e calcula-se o volume (VS) da solução S a ser utilizado para obter-se a densidade dX' .

Todas as densidades devem ser verificadas em densitômetro.

Para evitar a mistura entre as diferentes soluções, principalmente do soro com a primeira solução por possuírem densidades muito próximas, além de um resfriamento da primeira solução todo o processo de preparação do gradiente foi realizado com os tubos levemente apoiados em gelo.

O soro, já com a densidade verificada, por sua vez foi mantido em temperatura ambiente ou levemente aquecido em banho-maria a 37°C.

Após a realização dos gradientes (Ver Figura 8) os tubos são depositados cuidadosamente nos suportes de rotores móveis SW41 de ultracentrífuga Beckman (USA) e se realiza a ultracentrifugação a 40,000 rotações por minuto, durante 48 horas, em vácuo e à temperatura de 15°C.

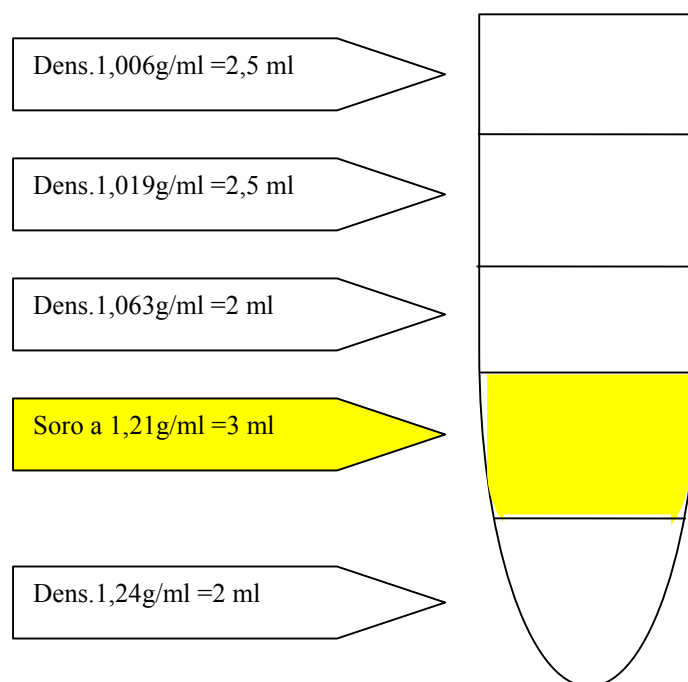


Figura 8 - Preparação dos gradientes para separação das lipoproteínas por Ultracentrifugação

Durante a centrifugação, as lipoproteínas cujas densidades variam entre 1,019 e 1,063 g/ml para as subfrações de LDL e 1,063 e 1,21 g/ml para as HDL são submetidas aos efeitos da força de centrifugação e à força de flotação. As lipoproteínas se deslocam pelos gradientes até que cheguem ao ponto respectivo de suas densidades.

Portanto, o objetivo desta ultracentrifugação é obter o equilíbrio isopícnico das lipoproteínas dentro de um gradiente de densidade.

Recuperação das diferentes subfrações de lipoproteínas

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) correspondem aos 800 μ l iniciais e são as primeiras a serem coletados do tubo. (Ver Figuras 9 e 10) As subfrações subjacentes são em seguida coletadas com pipeta em volumes exatos de 800 μ l para o LDL, correspondendo às subfrações: LDL1, LDL2, LDL3, LDL4, LDL5.

Posteriormente, coleta-se 1.200 μ l que correspondem à subfração HDL2b. As subfrações HDL2a, HDL3a e HDL3b correspondem a volumes de 800 μ l cada uma, e são recuperados sucessivamente.

Finalmente, para evitar a contaminação por proteínas na última e mais densa subfração HDL3c, coleta-se somente 500 μ l no lugar dos 800 μ l habituais.

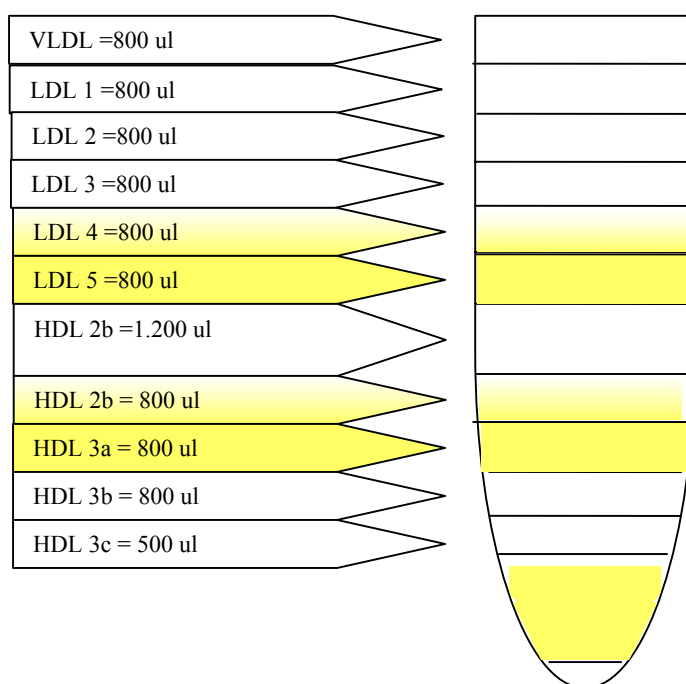


Figura 9 - Separação das Subfrações de LDL e HDL

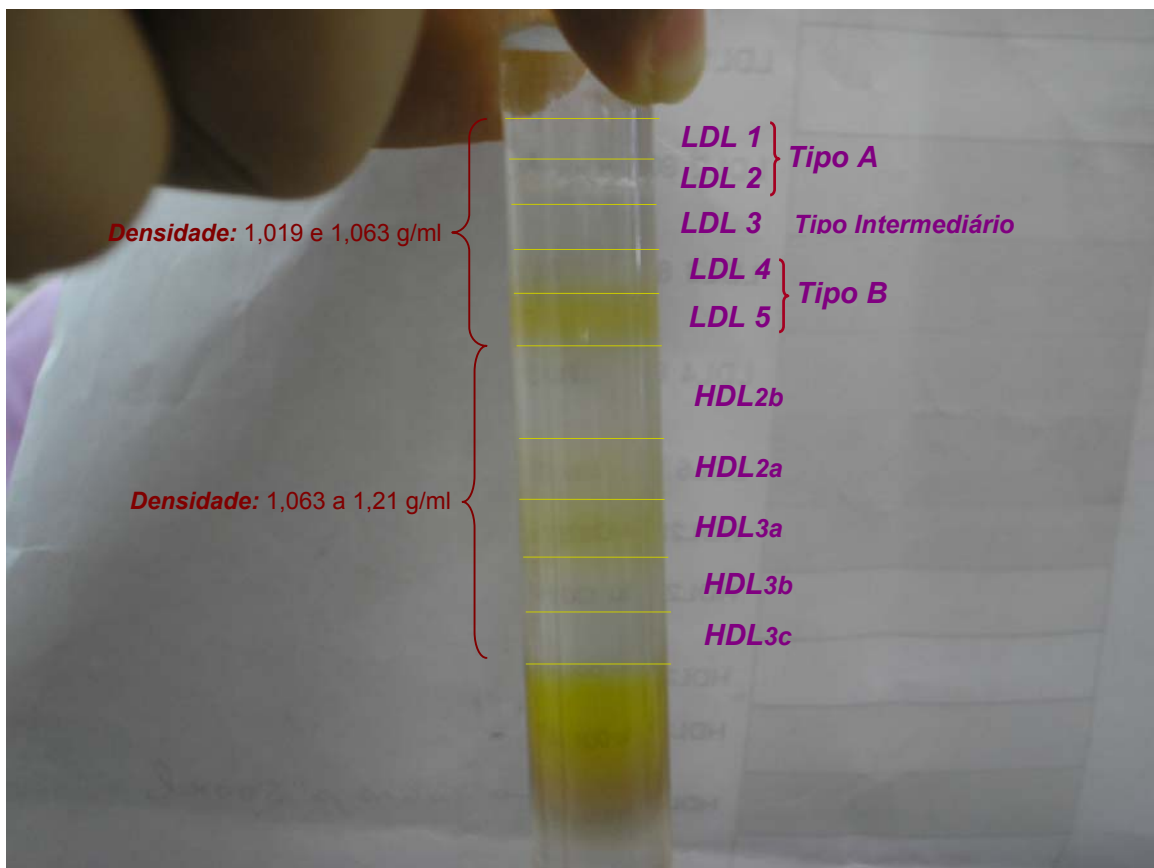


Figura 10 - Classificação das Subfrações de LDL e HDL.

As partículas de LDL estão no intervalo de densidade entre 1,019 a 1,063 g/mL e as de HDL no intervalo entre 1,063 a 1,210 g/mL

Diálise das subfrações HDL isoladas

Antes de analisar as subfrações do ponto de vista bioquímico e utilizá-las nos experimentos de oxidação *in vitro* é necessário eliminar o KBr através de diálise em solução de PBS (pH 7,2) e de Resina extratora (Chelex) durante 48h, à 4°C, sob agitação. Troca-se o banho de diálise a cada 08 horas para um máximo de 2 trocas. Após a diálise, as subfrações de

HDL são recuperadas e conservadas à 4°C para diferentes análises por no máximo 15 dias.

Em suma, as cinco subfrações de HDL são isoladas: as grandes e menos densas, HDL2b (d=1,063 - 1,090 g/ml) e HDL2a (d=1,090 - 1,120 g/ml), e as pequenas e densas, HDL3a (d=1,120 - 1,150 g/ml), HDL3b (d=1,150- 1,180 g/ml) e HDL3c (d=1,180 - 1,210 g/ml).

Análise química das lipoproteínas

Os conteúdos de proteína total (PT), colesterol total (CT), colesterol livre (CL), fosfolipídios (PL) e triglicérides (TG) das subfrações de HDL foram determinados utilizando-se testes enzimáticos comercialmente disponíveis. Éster de colesterol (CE) foi calculado através da diferença entre o colesterol total e o livre dividido por 1,6744. ApoA-1 e apoB foram dosadas utilizando-se testes de imunonefelometria.

ANÁLISES FÍSICAS E FUNCIONAIS DAS LIPOPROTEÍNAS

- Análise da Capacidade antioxidativa das partículas de LDL

A oxidação *in vitro* do LDL por íons metálicos ocorre em 3 fases: uma fase inicial de consumo de antioxidantes endógenos (fase de resistência ou *lag phase*), uma fase de rápida oxidação de ácidos graxos insaturados para lípídeos hidroperóxidos (fase de propagação ou *propagation phase*), e uma fase de formação de aldeídos reativos (*decomposition phase*). Estes

aldeídos reagem com resíduos de lisina nas partículas apoB-100, resultando em LDL oxidados.⁵³

A técnica está detalhada mais a seguir, na análise da capacidade antioxidativa das HDL.

- Análise do Tamanho das Partículas de HDL

O tamanho das partículas de HDL foi mensurado por espalhamento de luz já padronizado no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor¹⁰⁸, utilizando o equipamento Laser Light Scattering (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.).

As amostras dos indivíduos foram coletas em jejum de 12 horas, em tubos de EDTA (1,5G/d/L) e o plasma obtido após centrifugação por 10 minutos, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7.

Em seguida obteve-se a fração de HDL por precipitação química das partículas lipoprotéicas e seus remanescentes que contém apo B utilizando uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 (400 g/L), na proporção 1:1 (vol/vol). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,10 mmol/L e filtrado através de passagem em filtro com porosidade 0,22 µm.

Os diâmetros (nm) das partículas de HDL em solução foram determinados por coleta das leituras pela luz espalhada, coletada em um ângulo de 90°, e expressos pelo resultado médio obtido de 5 leituras (1 leitura por corrida).

- Transferência de Lipídeos para HDL

Foi realizada a mensuração da Transferência de Colesterol Livre e Esterificado, Fosfolípidos e Triglicérides, todos marcados radioativamente, que estavam misturados num meio artificial de micelas de lípidos (LDE) para a HDL dos participantes.

A LDE foi preparada segundo a técnica anteriormente descrita.^{109, 110} Resumidamente, em um frasco, foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de triglicérides (Sigma Chemical Co – St. Louis, EUA), a partir de estoques preparados em clorofórmio/metanol (2:1) (Merck – Darmstadt, Alemanha). Foram adicionados 70 kBq de ¹⁴C-oleato de colesterol, 121 kBq de ³H-triglicérides (Amersham International – Reino Unido). A seguir, a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria 37°C e mantidas em dessecador a vácuo, por 16 horas, a 4°C, para remoção dos solventes residuais. A mistura de lípidos ressuspensa com tampão-tris HCl, foi então emulsificada por irradiação ultra-sônica de 125 watts de potência, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) durante 3 horas, sob uma atmosfera de nitrogênio com temperatura variando de 51 e 55°C. Para obtenção da LDE na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW -41). Na primeira etapa o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos a 4°C, foi removido por aspiração (1 ml) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade

para 1,21 g/ml. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a LDE foi recuperada no topo do tubo por aspiração. Removeu-se o excesso de KBr por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01M, pH 8. Em seguida, a emulsão foi esterilizada através de passagem em filtro Millipore 0,22 µm de diâmetro. O procedimento de preparo das nano-emulsões foi realizado em capela de fluxo laminar. Todo material utilizado foi esterilizado em autoclave a 120°C e despirogenizado em estufa 180°C durante 90 minutos.

A reação de transferência de Colesterol ester (CE), Fosfolípides (PL), Triglicérides (TG) e Colesterol Livre (CL) para a HDL ocorre resumidamente da seguinte forma:

Amostras dos pacientes foram coletadas após jejum de 12 horas, em EDTA (1,5 g/L) e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7.

A transferência de CE, PL e CL foi determinadas pelo método de substrato exógeno.^{111, 112}

Nano-emulsões lipídicas (50µl) marcadas radioativamente com oleato de colesterol (CE-³H) e fosfolípides (PL-¹⁴C) ou colesterol livre (CL-³H) foram incubadas com 200 µl de plasma por 1 hora a 37°C em agitador orbital Gyromax 706R sob agitação de 40 rpm. Decorrido o tempo, foram adicionados à solução 250µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2% / MgCl₂ 3M, vol/vol). A solução foi agitada em vortex por 30 segundos e em seguida centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante, contendo a HDL

foram pipetadas em frascos de cintilação e adicionados 5,0 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA). A radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packed 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do Software Plus Vers 5.01 da Diamond Computers, para obtenção das contagens de ^{14}C e ^3H das amostras. O branco neste experimento consiste em um mistura de 200 μL de solução tampão TRIS-HCL e 50 μL de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições acima.

O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pelo incubação de 200 μL de plasma com 50 μL de LDE, seguida de incubação, porém sem adição de reagente precipitação. As transferências de CE, PL e CL foram expressas como percentagem de CE- ^3H , PL- ^{14}C e CL- ^3H em relação à radioatividade total incubada.

A transferência dos lípides da LDE para HDL foi analisada sob diferentes condições adversas de temperatura, pH, tempo de incubação e concentração de albumina. Para avaliar a influência da temperatura, a transferência dos lípides foi realizada a temperaturas que variaram de 0° a 40°C. O efeito do pH foi avaliado em pH plasmático variando de 6,5 a 8,0, obtido pela adição de solução tampão Tris HCL ou Tris NaOH. Para testar a influência do tempo de incubação, o ensaio foi feito sob diferentes períodos de incubação, variando de 0 a 4 horas. O efeito da concentração de albumina no plasma foi testado em uma taxa de concentração de 3,6 a 7,2 mg/dl. Foi também testado o efeito na transferência com quantidades

crescente de massa de lípidos da LDE (0,75 a 1,50 mg/ μ L) e HDL-colesterol (33 a 244 mg/dL). Após cálculos, o resultado da atividade é expresso como porcentagem de colesterol livre transferido para HDL por ml de plasma.

- Atividade antioxidante das subfrações de HDL

Com a finalidade de avaliar *in vitro* o efeito protetor das subfrações de HDL contra a peroxidação lipídica do LDL, foi realizada a oxidação do LDL isolado de um mesmo indivíduo normolipidêmico controle de referência (LDL referência) sozinho ou em presença das subfrações de HDL2a ou 3b.

Para análise da função antioxidante do HDL analisamos a modificação do retardamento de tempo ("*Lag time*") da reação de oxidação *in vitro* de LDL, proveniente de doador saudável, pela adição de sulfato de cobre em presença ou não de HDL do paciente a ser testado, também de acordo com técnicas já previamente descritas.¹¹³

Resumidamente, preparações de amostras de LDL são misturadas tanto isoladamente como com HDL, ambas em concentrações pré-estabelecidas, e incubadas com 50 μ mol/L CuSO₄ por cerca de 4 horas. As reações são monitoradas continuamente a 234 nm com um espectrofotômetro HITACHI U2001 em temperatura controlada e o grau de oxidação foi determinado pelo aumento de dienos conjugados (DO=234 nm).

As LDL referência, isoladas do plasma por ultracentrifugação, foram dialisadas contra PBS sem EDTA e, a seguir, diluídas para obter uma concentração de 40 mg de proteína de LDL em 500 μ L de H₂O deionizada.

Logo após, adicionou-se 80 μ g de proteína de HDL3 ou HDL2a seguido de 1 mL de solução de CuSO₄ (50 μ mol/L concentração final), a

37°C. O tubo branco consistiu apenas de incubação de LDL e cobre. A cinética de formação de dienos conjugados foi determinada pela variação na absorvância, monitorada continuamente em 234 nm, durante 4 h, em intervalos de 3 minutos.

Dividimos esta reação em 3 fases:

A primeira, chamada Fase Retardo inicial (ou *Lag Phase*), corresponde ao consumo de antioxidantes endógenos e representa o tempo em que estas lipoproteínas resistem à oxidação e é determinado pelo ponto onde o incremento linear da absorvância cruza com a linha do tempo. (ver Figura 11).

A segunda fase, chamada Fase de Propagação, é mais rápida e corresponde à formação de produtos peroxidação lipídica (formação de dienos conjugados) após vencida a proteção antioxidante das partículas. A razão máxima de formação de dienos conjugados é representada pela divisão da absorvância máxima pelo tempo em que ela ocorreu. Quanto menor este valor, mais lenta é a produção de dienos conjugados em LDL.¹¹⁴

A terceira fase, chamada Fase de Estabilização (ou degradação dos dienos), é quando se formam aldeídos que reagindo com a apoB das LDL resultam em LDL oxidados.

Neste estudo calculou-se as diferenças percentuais do tempo ("*lag time*" em minutos) da resistência das LDL à oxidação ("*lag phase*") com a adição de subfrações de HDL2a e 3b dos pacientes com SMet, obtidas antes e depois do TF.

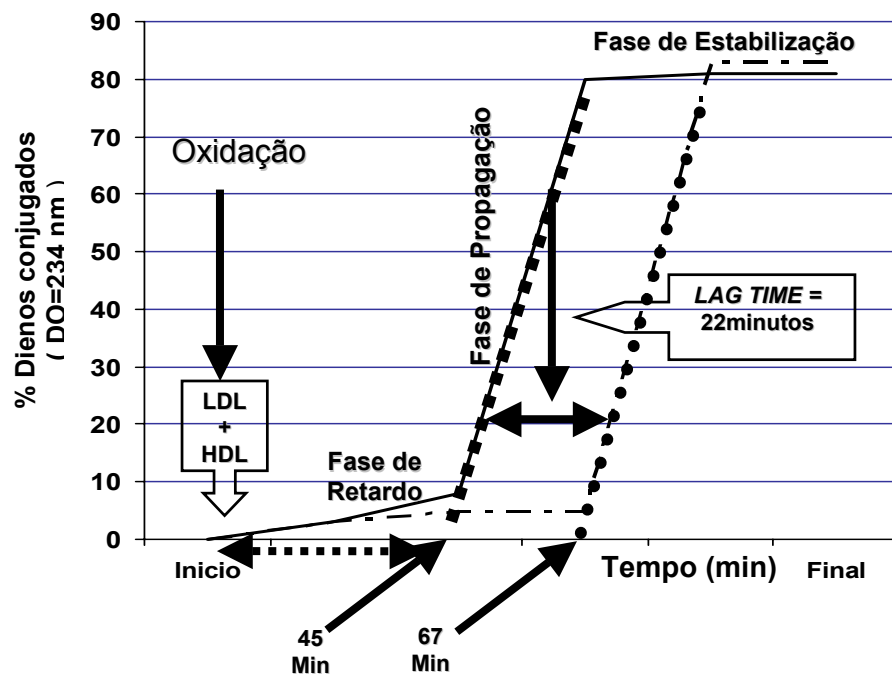


Figura 11 - Exemplo da influência da HDL na oxidação *in vitro* da LDL

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS for Windows 10 da SPSS Inc. USA. O tamanho da amostra de 20 pacientes foi calculado para discernir diferenças de média de pelo menos um desvio padrão das variáveis estudadas, considerando probabilidade de erro tipo I, p de alfa de 0,05 e erro tipo II p beta de 20%, poder de teste 80%. As variáveis contínuas foram expressas em médias e desvio padrão e as comparações, para antes e depois do exercício, foram analisadas por Testes não paramétricos (Wilcoxon) ou T-pareado, quando aplicável.

3. RESULTADOS

Foram estudados 40 indivíduos sedentários dos quais 30 eram portadores de SMet. Dos pacientes com SMet, 20 realizaram o protocolo de Treinamento Físico.

As medidas antropométricas de todos os pacientes com SMet participantes do estudo, antes do treinamento físico, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Medidas Gerais dos Pacientes com SMet

Paciente (Sigla)	Idade (anos)	Altura (cm)	Peso (kg)	IMC	CA (cm)	CQ (cm)	A/Q	PA (mmHg)	FC (bpm)	MD
♀ N=17										
ACO	43	160	75,2	29,3	94	103	0,91	135/85	76	
AMM *	45	160	70,1	27,3	96	106	0,90	140/90	80	I
AMS	50	161	80,3	30,8	97	102	0,95	130/80	74	
APM * ##	37	165	100,9	36,7	112	128	0,8	130/80	82	An, I
CAV	47	147	67,1	31,0	95	102	0,93	140/90	78	
EOV	48	162	87,4	33,2	104	111	1,06	150/90	65	H
I F A * ##	47	159	73,2	28,8	108	105	0,97	141/92	88	I, M
L A L * ##	29	155	89,7	37,0	116	123	1,06	140/100	77	I
LL *	49	154	73,2	30,7	102	109	0,93	140/90	70	
M C C *	61	148	60,1	27,3	92	100	0,92	120/80	70	I
M L V	55	167	91,5	32,6	103	117	1,13	140/95	78	B
M M P * ##	52	156	70,2	28,7	95	103	1,08	135/95	82	H, I, M An, H,
M R S *	49	151	89,2	39,0	133	117	0,87	135/95	87	I
MSN	54	146	68,1	31,9	106,5	114	1,07	140/90	78	An,B,H
P C Z * ##	41	168	88,4	31,0	108	119	1,10	145/95	76	I
S C S *	57	158	81,3	36,7	105	119	1,12	150/90	70	H, I
V L C * ##	40	155	85,4	35,3	112,5	118	1,04	140/90	72	I
Média♀	47,2	157,1	79,5	32,1	104,6	111	0,94	138/89	76,6	
±DP	7,8	6,6	10,9	3,6	10,2	8,5	0,24	7,2/ 5,9	6,1	
♂ N=13										
A P *	69	166	99,2	36	121	123	1,01	150/90	70	B
A S J *	47	173	99,3	33	121	108	0,89	150/90	69	I
CF	63	168	84,0	29,8	105	101	1,03	140/90	74	B
D O M *	57	170	99,1	34,2	116	122	1,05	160/100	80	B
F C S *	58	160	81,4	31,6	112	101	0,90	135/100	72	I, M
J C P	55	171	94,5	32	105	107	1,02	145/90	64	I
J R A	52	166	82,4	29,9	107	104	1,02	140/90	78	I
L C P *	47	166	88,3	32	112	109	0,97	130/88	76	I, M
L C S *	52	165	89,1	32,6	109	114	1,04	120/90	70	B
O N D *	51	172	102,1	34,4	116	112	1,03	140/90	80	I, H
O R D *	55	159	77,3	30,5	105	100	0,95	160/95	72	I, M
S B C *	31	173	110,0	36,7	123	121	0,98	140/90	75	B
S M G *	55	170	86,2	29,6	114	104	1,09	130/90	70	B, M
Média♂	53,2	167	91,7	32,4	112,7	109	0,99	141/91	73,0	
±DP	8,9	4,5	9,6	2,3	6,4	8,1	0,58	11,6/3,9	4,6	
Média♀♂	49,8	161,7	84,8	32,3	108,1	111	1,0	139/90	75,1	
±DP	±8,7	±7,7	±11,9	±3,0	±9,5	±8,4	±8,2	9,3/ 5	±5,7	

• Pacientes que realizaram Programa de Treinamento Físico. ## Pacientes Férteis.

Abreviaturas: m=metro, cm=centímetro, mmHg=milímetros de mercúrio, bpm=batimentos por minuto, IMC=índice de massa corpórea, CA=circunferência Abdominal, CQ=circunferência do quadril, A/Q=Relação Circunferências Abdominal e Quadril, PA=Pressão Arterial, FC=Frequência Cardíaca, MD=Medicação, An=Anlodipina, B=Bloqueador do Receptor da Angiotensina, I=Inibidor de Enzima de Conversão da Angiotensina, H=Hidroclorotiazida, M= Metformina

Os Dados Antropométricos dos participantes Normais que serviram de Controle no estudo (N-Controle) estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Medidas gerais dos participantes normais - controle

Paciente	Idade anos	Altura cm	Peso kg	IMC	CA cm	CQ cm	A/Q	PA (mmHg)	FC (bpm)
♀									
ACC	41	166	62,4	22,5	76	98	0,77	110/70	72
TOS	44	154	58,2	24,4	86	97	0,88	115/82	80
SMF	37	168	66,4	23,3	83	99	0,83	120/70	70
ELO	44	163	60,1	22,5	87	104	0,83	115/70	73
Média ♀	41,5	162,7	61,7	23,1	83	99,5	0,83	115/73	73
± DP	3,3	6,1	3,5	0,9	4,9	3,1	0,45	4/ 6	4,3
♂									
AFS	46	165	73,1	26,8	97	102	0,95	125/80	62
IVO	46	174	75,3	24,7	89	100	0,89	120/75	63
JAC	63	169	86,3	29,7	99	103	0,96	130/80	78
NEL	42	151	49	21,5	90	95	0,94	120/80	70
DAR	44	167	61,7	21,8	91	97	0,93	120/70	68
PNB	45	167	66,7	23,6	86	93	0,92	120/70	72
Média ♂	47,6	165,5	68,6	24,6	92	98	0,93	122/75	69
± DP	7,6	7,7	12,7	3,1	4,9	3,9	0,25	4,1/4.9	5,9
Média									
♀♂	45,2	164,4	65,9	24,0	88,4	98,8	0,98	119/75	71
± DP	6,8	6,9	10,3	2,5	6,6	3,5	0,06	5,5/5,2	5,6

Analisando os dados das tabelas 1 e 2 podemos observar que os pacientes com SMet inclusos neste protocolo tem uma discreta diferença na média de idade em relação ao grupo controle (49,8 ± 8,7 vs 45,2±.6,8 anos, SMet e Normais respectivamente). Também peso, circunferência abdominal, pressão arterial são superiores aos dos normais controles, sendo entretanto estes parâmetros as características da SMet.

Na Tabela 3 encontram-se os valores individuais de VO₂ pico alcançados pelos pacientes com SMet que realizaram TF

Todos os participantes realizaram teste de esforço ergoespiromérico sendo que os pacientes com SMet repetiram o teste ou ao final do TF, quem realizou o protocolo de exercícios, ou após um período de 4 meses de intervalo naqueles que serviram de controle sem TF.

A média de VO₂ máximo dos pacientes com SMet foi 20% maior aos valores prévios do TF, sendo este um incremento significativo em comparação aos valores basais.

Tabela 3 - Valores de VO₂ pico (mL.kg⁻¹.min⁻¹) obtidos no teste ergoespirométrico dos Pacientes com SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF

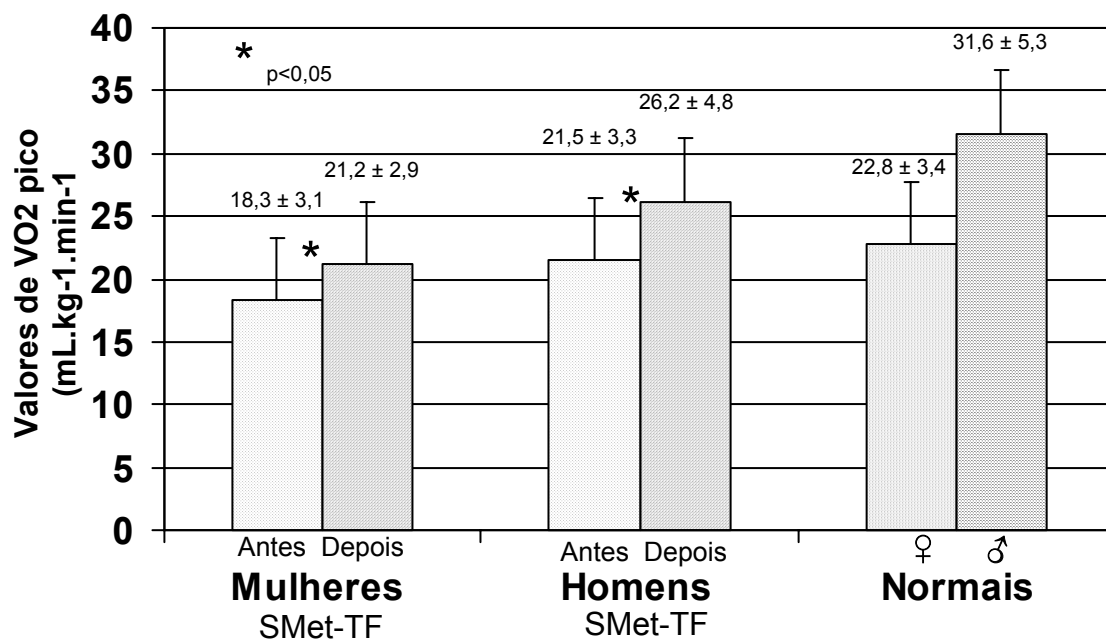
Nome	VO ₂ pico (ml/kg.min)	VO ₂ pico (ml/kg.min)
♀	A	D
AMM	18	20,6
IFA	19,6	22,4
LAL	19,5	24,2
LL	20,6	21,9
MCC	20,8	21,7
MMP	16,4	19,9
MRS	16,1	18,8
PCZ	17,3	20,2
SCS	12	16
VLC	23,4	27
Média ♀	18,3	21,2
±DP	3,1	2,9
		P<0,05
♂		
AP	11,5	19,8
ASJ	20,7	22,7
DOM	27,6	32,5
FCS	22,6	24
JCP	19,2	34,2
LCP	22	26,4
LCS	20,0	27,7
ORD	22,6	28,2
SBC	29,5	26,6
SMG	19,2	19,8
Média ♂	21,5	26,2
±DP	4,9	4,8
		P<0,05
Média ♀♂	19,9	23,7
±DP	4,3	4,6
		p=0,005

Comparando-se os resultados de VO₂ máximo obtidos pelos participantes normais controle (Tabela 4) e pelos pacientes SMet que realizaram TF, observa-se nitidamente que os portadores de SMet

melhoraram substancialmente seu condicionamento físico com o treinamento, atingindo índices de VO₂ próximos aqueles obtidos pelo grupo normal controle. O grupo das mulheres com SMet conseguiu alcançar níveis de VO₂ máximo muito próximos ao das mulheres normais (pico de VO₂ de mulheres SMet 21,2±2,9 vs mulheres normais 22,80±3,3 e homens SMet 26,2±4,8 vs homens normais 31,6 ±5,3 ml/kg.min respectivamente) (ver Figura 12)

Tabela 4 – Valores de VO₂ pico (mL.kg⁻¹.min⁻¹) obtidos no Teste Ergoespirométrico dos Participantes Normais-Controle

Nome	VO ₂ pico (ml/kg.min)
♀	
ACC	19,2
TOS	20,7
SMF	25,4
ELO	25,9
Média ♀	22,8
±DP	3,3
♂	
AFS	32,4
IVO	33,4
JAC	27,6
NEL	25,3
DAR	30,5
PNB	40,6
Média ♂	31,6
±DP	5,3
Média ♀♂	28,1
±DP	6,3



Média ± DP dos valores de VO₂ máximo de mulheres e homens SMet Antes e Depois do TF e de participantes Normais Controle mulheres e homens.

Figura 12 - Variação do VO₂ máximo alcançados por pacientes SMet que realizaram TF e participantes Normais de Controle

Os pacientes SMet que não realizaram TF apresentaram medidas de VO₂ máximo muito inferiores aos obtidos pelos participantes Normais de Controle (16,7±4,0 vs 17,0±3,3 e 28,1±6,3 ml/kg.min, SMet sem TF e normais respectivamente) não apresentando nenhuma alteração significativa deste parâmetro nos 4 meses de observação. (Tabela 5)

Tabela 5 - Valores de VO₂ pico (mL.kg⁻¹.min⁻¹) obtidos no Teste Ergoespirométrico dos pacientes com SMet-Controlado Início(I) e Final(F) dos 4 meses de acompanhamento

Nome	VO ₂ pico (ml/kg.min)	VO ₂ pico (ml/kg.min)
♀	I	F
ACO	14,2	15
AMS	12,8	13,6
APM	16,6	17,2
CAV	15,1	14
EOV	14,5	15
M L V	12,4	16,2
MSN	15,2	14,8
Média ♀	14,4	15,1
±DP	1,4	1,2
		p>0,05
♂		
CF	21,5	22
JRA	22,9	21,8
O N D	22,7	21
Média ♂	22,3	21,7
±DP	0,7	0,6
		p>0,05
Média ♀♂	16,7	17,0
±DP	4,0	3,3
		p=0,593

As medidas dos pacientes com SMet que realizaram o programa de exercícios (SMet-TF), nas situações antes(A) e depois(D) TF, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Medidas dos Pacientes com SMet Antes(A) e Depois(D) do TF

Nome	Peso kg	Peso kg	IMC	IMC	CA cm	CA cm	PA mmHg	PA mmHg	FC bpm	FC bpm
♀	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
AMM	70,1	69,2	27,3	26,9	96	94	140/90	140/90	80	78
IFA	73,2	73,8	28,8	29	108	102	141/92	130/90	88	76
LAL	89,7	87,1	37	36,2	116	112	140/100	130/85	77	70
LL	73,2	73,4	30,7	30,7	102	101	140/90	135/90	70	74
MCC	60,1	60	27,3	27,3	92	90	135/90	130/90	70	72
MRS	89,2	88,3	39	38,9	133	130	135/95	140/92	82	70
MMP	70,2	70,1	28,7	28,8	95	94	140/90	135/95	78	72
PCZ	88,4	95,3	31	33,6	108	108	145/95	135/95	76	72
SCS	81,2	82,9	32,5	33,2	105	104	150/90	135/88	70	75
VLC	85,4	84,2	35,3	34,9	112,5	104	140/90	140/90	72	70
Média ♀	78,0	78,4	31,7	31,9	106,7	103,9	140/92	135/90	76,3	72,9
± DP	10,1	10,8	4,1	4,0	12,0	11,3	4,3/3,4	4/ 2,9	6,0	2,7
p		0,668		0,538		0,008		0,01/0,32		0,108
♂										
AP	99,2	99,5	36	35,9	121	110	150/90	145/90	70	76
ASJ	99,3	97,7	33	32,4	121	115	150/90	150/95	69	66
DOM	99,1	100,2	34,2	34,4	116	114	160/100	140/90	80	66
FCS	81,4	79,1	31,6	30,8	112	109	135/100	130/90	72	70
JCP	94,5	93,8	32	31,8	105	108	145/90	140/90	64	68
LCP	88,3	89,6	31,9	32,3	112	112	130/88	130/80	70	72
LCS	89,1	88,3	32,6	32,3	109	106	120/90	120/80	76	70
ORD	77,3	74,8	30,5	29,6	105	101	160/95	136/90	80	72
SBC	110	108,1	36,7	36	123	115	140/90	140/85	72	74
SMG	86,2	86,8	29,6	29,8	109	107	130/90	120/80	70	70
Média ♂	92,4	91,7	32,8	32,5	113,3	109,7	142/92	135/87	72,3	70,4
± DP	9,8	10,1	2,2	2,2	6,6	4,4	13,3/4,4	10/ 5,3	5,0	3,2
p		0,180		0,086		0,019		0,03/0,01		0,349
Média ♀♂	85,2	85,1	32,3	32,2	110,0	106,8	141/92	135/88	74,3	71,6
± DP	±12,1	±12,2	±3,2	±3,2	±10,0	±8,9	9,7/3,8	7,4/ 4,5	±5,7	±3,1
p		0,75		0,793		0,001		<0,05/0,05		0,061

Podemos observar que os pacientes portadores de SMet que realizaram TF não apresentaram alterações significantes de peso (e conseqüentemente de índice de massa corporal) antes e após o treinamento porém, apresentaram redução significativa da circunferência da cintura abdominal.

Já os pacientes SMet-Controle sem TF, cujos dados ao Início e ao final de 4 meses de acompanhamento estão na Tabela 7, apresentaram aumento de peso, IMC e Circunferência abdominal.

O TF proporcionou redução da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC) nos pacientes com SMet porém, somente os níveis pressóricos alcançaram significância. No grupo SMet controle sem exercícios não houve alterações destes parâmetros.(Tabela 7)

Tabela 7 - Medidas dos Pacientes com SMet-Controle sem TF no Início(I) e Final(F) de 4 meses de acompanhamento

Nome	Peso kg	Peso kg	IMC	IMC	CA cm	CA cm	PA mmHg	PA mmHg	FC bpm	FC bpm
♀	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
AMS	80,3	80,0	30,8	31	97	98	130/80	130/80	74	80
ACO	75,2	76,5	29,3	29,6	94	96	135/90	135/85	76	72
APM	100,9	99,7	37,1	36,8	112	113	130/80	130/80	82	70
EOV	87,2	88,1	33,2	33,3	100	100	160/90	140/90	65	78
CAV	67,1	68	31	31,2	95	97	140/90	140/90	78	72
MLV	91,5	92,1	32,6	33,1	103	103	140/95	150/95	78	78
MSN	68,1	70	31,9	33,7	106	105	140/90	140/90	70	74
Média ♀	81,4	82	32,3	32,6	101	101,7	139/87	137/87	74,7	74,8
±DP	12,4	11,7	2,4	2,3	6,4	5,9	10/5,6	6,9/5,6	5,6	3,8
p		0,184		0,197		0,140		0,69/0,35		0,965
♂										
CF	84	83,2	29,8	29,4	105	105	140/90	140/90	74	76
JRA	82,4	83,3	29,9	30	107	107	140/90	140/90	78	80
O N D	102,1	101	34,4	34,1	112	113	140/90	140/90	80	76
Média ♂	89,5	89,1	31,3	31,1	108	108,3	140/90	140/90	77,3	77,3
±DP	10,9	10,2	2,6	2,5	3,6	4,1	0,9/0,9	0,9/0,9	3,0	2,3
p		0,646		0,321		0,423		>0,05/0,05		0,9
Média ♀♂	83,8	84,1	32,0	32,2	103,1	103,7	139/88	138/88	75,5	75,6
±DP	12	11,2	2,4	2,3	6,5	6,1	8,3/4,7	5,7/4,8	5,0	3,5
p		0,388		0,342		0,08		0,67/0,34		0,965

Todos os participantes foram submetidos a teste de Bioimpedância para análise da composição corporal de água, massa magra e gordura para análise de possíveis alterações destes parâmetros pelos exercícios.

Nos pacientes SMet que fizeram o TF, apesar de não terem apresentado alteração ponderal significativo ao final do protocolo, tiveram um aumento porcentual de massa magra e uma diminuição de gordura que entretanto, não alcançaram níveis de significância. (Tabela 8). Não houve alterações nos níveis de hidratação, antes e depois do TF.

Tabela 8 – Medidas de Bioimpedância dos Pacientes com SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF

Nome	% Água A	% Água D	% Massa A	% Massa D	% Gordura A	% Gordura D
♀						
AMM	40	41	56	58	44	42
I F A	47	44	64	60	36	40
L A L	40	40	54	55	46	45
LL	41	42	58	60	42	40
M C C	49	50	66	69	34	31
M R S	40	39	54	54	46	46
M M P	50	51	68	70	32	30
P C Z	39	40	53	55	47	45
S C S	41	42	56	58	44	42
V L C	42	41	58	56	42	44
Média ♀	42,9	43	58,7	59,5	41,3	40,5
±DP	4,12	4,18	5,37	5,66	5,37	5,66
p		0,823		0,280		0,280
♂						
A P	51	53	70	72	30	28
A S J	51	52	69	71	31	29
DOM	49	53	68	72	32	28
F C S	43	44	59	58	41	40
J C P	52	53	70	73	30	27
L C S	50	49	69	67	31	33
L C P	50	46	68	62	32	38
ORD	50	51	69	70	31	30
S B C	45	47	62	65	38	35
S M G	49	49	65	67	35	33
Média ♂	49,0	49,7	66,9	67,7	33,1	32,1
±DP	2,82	3,22	3,72	4,9	3,7	4,48
p		0,322		0,423		0,311
Média ♀♂	45,9	46,3	62,8	63,6	37,2	36,3
±DP	4,65	5,0	6,16	6,65	6,16	6,57
p		0,322		0,179		0,128

Os pacientes SMet controle (Tabela 9) também não tiveram alterações significativas de hidratação ou na composição de massa magra e gordura nos 4 meses de observação (43,1%±3,9 vs 42,7%±3,6; 59,7%±5,5 vs 58,1%±6,2; 40,3%±5,5 vs 40,9%±6,1 respectivamente)

Tabela 9 – Medidas de Bioimpedância dos Pacientes com SMet-Controle Início (I) e Final (F) dos 4 meses de acompanhamento

Nome	% Água	% Água	% Massa	% Massa	% Gordura	% Gordura
♀	I	F	I	F	I	F
ACO	42	42	57	56	43	44
AMS	39	39	55	55	45	45
APM	36	36	50	49	50	51
EOV	47	47	64	64	36	36
CAV	47	46	64	63	36	37
MLV	41	42	56	54	44	46
MSN	41	40	56	54	44	46
♂						
CF	44	43	66	67	34	33
JRA	46	45	64	65	36	35
O N D	48	47	65	64	35	36
Média ♀♂	43,1	42,7	59,7	58,1	40,3	40,9
±DP	±3,9	±3,6	±5,5	±6,2	±5,5	±6,1
p		0,104		0,179		0,111

Interessante destacar que em todos os pacientes com SMet os níveis de Massa Magra foram inferiores, e os de Gordura superiores, aos encontrados nos participantes normais controle (Tabela 10) confirmando o elevado grau de obesidade dos portadores desta síndrome.

Tabela 10 - Medidas de Bioimpedância dos participantes Normais-Controle

Nome	% Água	% Massa	% Gordura
♀			
ACC	47	62	38
TOS	46	63	37
SMF	43	58	42
ELO	53	72	28
♂			
AFS	56	71	29
IVO	60	82	18
JAC	57	78	22
NEL	64	88	12
DAR	55	72	28
PNB	59	80	20
Média ♀♂	54	72,6	27,4
±DP	±6,7	±9,6	±9,6

Os resultados bioquímicos dos pacientes com SMet-TF nas situações antes e depois do TF encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados Bioquímicos dos Pacientes com SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF

Nome	CT mg/dl	CT mg/dl	TG mg/dl	TG mg/dl	HDL mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	LDL mg/dl	Glicose mg/dl	Glicose mg/dl
♀	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
AMM	178	176	157	154	40	39	106	106	108	100
I F A	209	237	195	206	36	44	139	152	101	141
LAL	183	178	230	210	34	36	103	96	98	96
LL	178	180	177	179	41	44	91	100	103	91
MCC	224	211	282	234	40	39	128	125	105	95
M R S	214	131	326	111	40	43	109	66	160	91
M M P	229	173	162	91	49	53	148	102	151	71
P C Z	236	199	230	213	39	34	151	119	101	98
S C S	216	197	370	330	34	30	129	101	91	90
V L C	196	218	166	104	35	27	158	170	107	91
Média ♀	206	190	229	183	38,8	39,9	126,2	113,7	112,5	96,4
±DP	21,4	29,30	74,2	72,3	4,4	7,6	22,9	29,6	23,2	17,5
p		0,167		0,052		0,95		0,116		0,175
♂										
A P	202	197	155	95	34	37	137	141	118	107
A S J	226	210	159	156	31	34	163	134	104	100
DOM	172	182	273	270	26	27	91	106	98	105
FCS	223	209	193	208	41	41	143	126	115	118
J C P	223	228	164	98	32	43	158	165	102	110
LCP	193	187	265	200	36	37	104	110	149	126
L C S	180	255	233	301	31	31	102	164	102	89
O R D	210	190	276	191	40	36	115	116	127	120
S B C	187	174	139	129	33	34	126	114	101	86
SMG	187	190	195	192	37	40	109	115	103	99
Média ♂	200	202	205	184	34,1	36,0	125	129	106	102
±DP	±19,4	±24,3	±52,6	±67,6	±4,5	±4,7	±24,6	±21,5	±10	±11
p		0,83		0,188		0,15		0,58		0,06
Média ♀♂	203,3	196	217,3	183	36,4	37,4	125,5	121,4	112,2	101,2
±DP	20,1	26,9	63,8	68,1	5,0	6,3	23,2	26,4	19,4	15,8
p		0,322		0,016		0,31		0,463		0,067

Os níveis sanguíneos de Colesterol Total, HDL, LDL e Glicemia dos pacientes SMet-TF não apresentaram diferenças significativas entre as situações antes e depois do TF. Por outro lado, as concentrações médias de Triglicérides apresentaram redução significativa, ressaltando-se porém que mesmo assim não atingiram valores considerados desejáveis pelas diretrizes.^{8,9,10,11} LDL teve uma pequena redução, ficando ainda em patamar muito alto após o treinamento, com valores superiores aos preconizados para este tipo de doença. Os níveis de HDL permaneceram estáveis e a glicemia, apesar de ter apresentado na situação pós treinamento uma diminuição em relação aos níveis de controle, não atingiu valores significantes.

Os resultados Bioquímicos obtidos num intervalo de 4 meses nos pacientes portadores de SMet, porém que não participaram do Treinamento Físico e que serviram de Controle (SMet-Controle) aos que realizaram o programa de exercício, podem ser observados na Tabela 12

Tabela 12 - Dados Bioquímicos dos Pacientes com SMet-Controlle - Intervalo de 4 meses sem TF

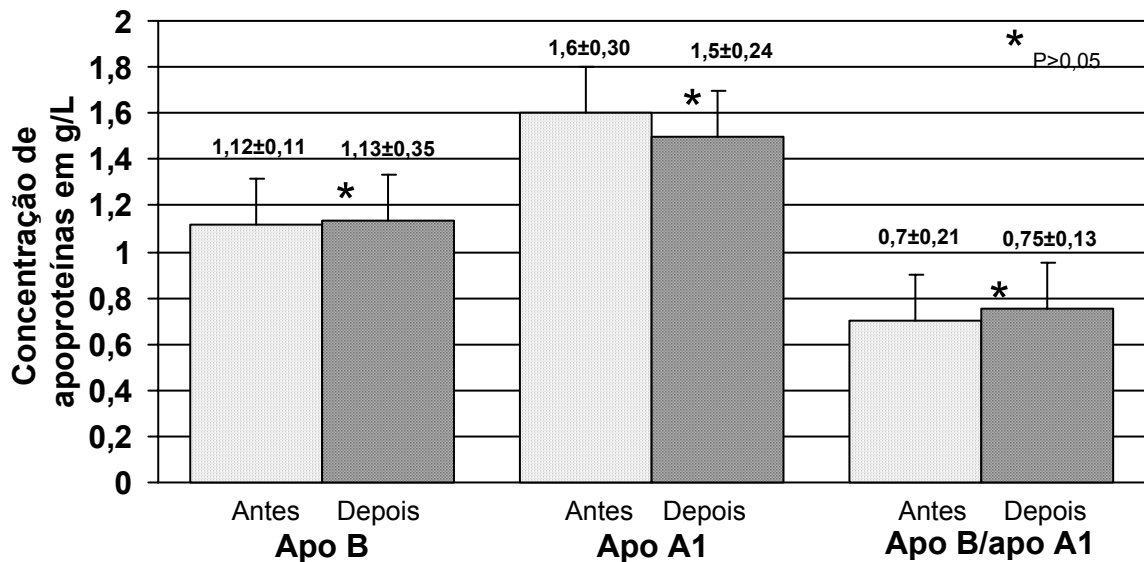
Nome	CT mg	CT mg	TG mg	TG mg	HDL mg	HDL mg	LDL mg	LDL mg	Glicose mg	Glicose mg
♀	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F
ACO	198	204	216	201	41	39	107	125	110	102
AMS	156	179	173	158	39	41	84	106	102	131
APM	194	212	154	201	39	35	124	136	106	95
CAV	193	186	154	137	44	39	118	119	97	91
EOV	216	198	177	145	44	43	136	126	105	112
M L V	235	221	258	232	36	47	125	127	86	94
MSN	213	220	299	190	40	43	113	130	106	100
Média ♀	200	202	204,4	180,6	40,4	41,0	115,2	124	101,7	103,5
±DP	24,7	16,2	55,9	34,7	2,8	3,8	16,6	9,5	8,0	13,9
p		0,730		0,217		0,790		0,088		0,739
♂										
CF	199	231	205	286	35	38	123	135	86	108
JRA	152	190	274	178	42	40	56	114	126	112
O N D	206	187	276	203	40	36	145	110	118	136
Média ♂	185,6	202,6	251,6	222,3	39,0	38,0	108	119	110	118
±DP	29,3	24,5	40,4	56,5	3,6	2,0	46,3	13,4	21,1	15,1
p		0,446		0,650		0,678		0,706		0,526
Média ♀♂	196	202	218,6	193,1	40,0	40,1	113,1	122,8	104,2	108,1
±DP	25,5	17,6	54,4	43,8	2,9	3,5	25,9	10,2	12,5	15,2
p		0,342		0,204		0,949		0,231		0,436

Pode-se notar que não houve alterações nos parâmetros bioquímicos dos pacientes SMet controle sem TF nos 4 meses de intervalo de análise

Os níveis de apoproteínas B e A1 também foram analisados nos paciente SMet antes e depois do TF. Não houve alterações significativas antes ($1,12 \pm 0,11$ vs $1,13 \pm 0,35$ g/L de apoA1 e apoB respectivamente, $p > 0,05$) ou depois ($1,6 \pm 0,3$ vs $1,5 \pm 0,24$ g/L de apoA1 e apoB respectivamente, $p > 0,05$) do TF. A relação apoB/apoA ($0,7 \pm 0,21$ vs $0,75 \pm$

0,13 antes e depois TF respectivamente, $p>0,05$) também não se modificou.

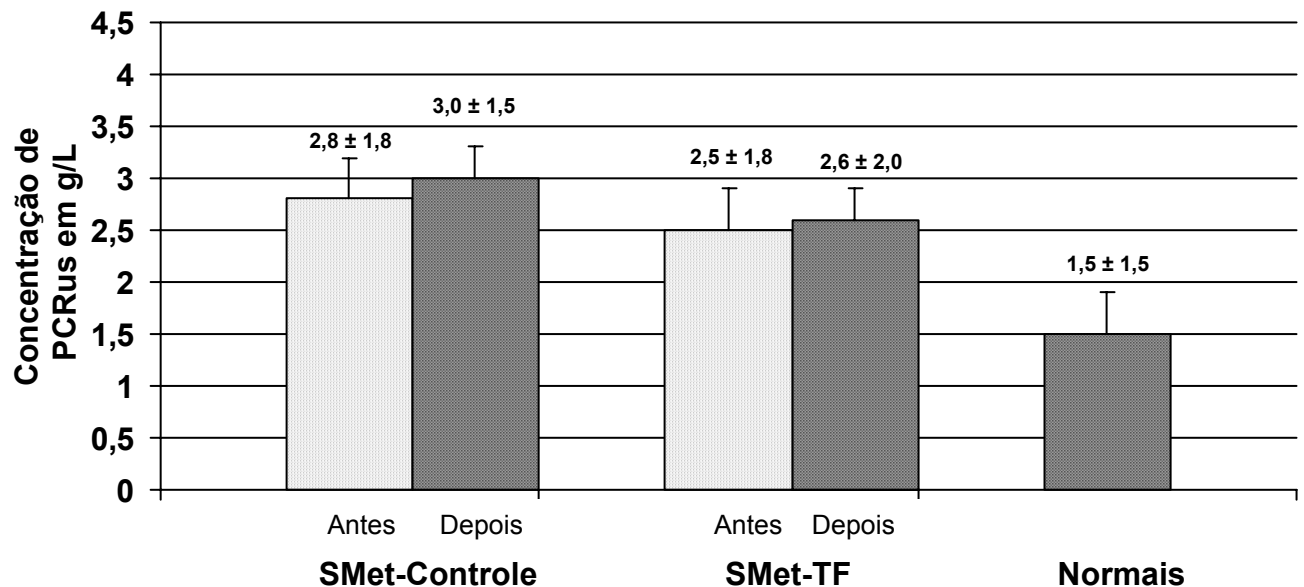
(Figura 13)



Médias \pm Desvio Padrão da concentração de apoproteínas em g/L. As concentrações de apoB, apoA1 e a relação apoB/apoA1 não alteraram ao TF ($p>0,05$)

Figura 13 - Valores de concentração de apoB, apoA1 e relação apoB/apoA de pacientes com SMet antes e depois do TF

Os níveis de Proteína C Reativa ultra sensível (PCRus), ao início e fim do protocolo, foram analisados e comparados. (Figura 14) Não houve alterações significativas em todos os grupos ($2,8 \pm 1,8$ vs $3,0 \pm 1,5$ g/L pacientes SMet controle no início e final do protocolo; $2,5 \pm 1,8$ vs $2,6 \pm 2,0$ g/L pacientes SMet antes e depois do TF respectivamente, $p>0,05$). Interessante notar que a concentração de PCRus dos participantes normais ($1,5 \pm 1,5$ g/L) era inferior a todos os outros grupos de pacientes.

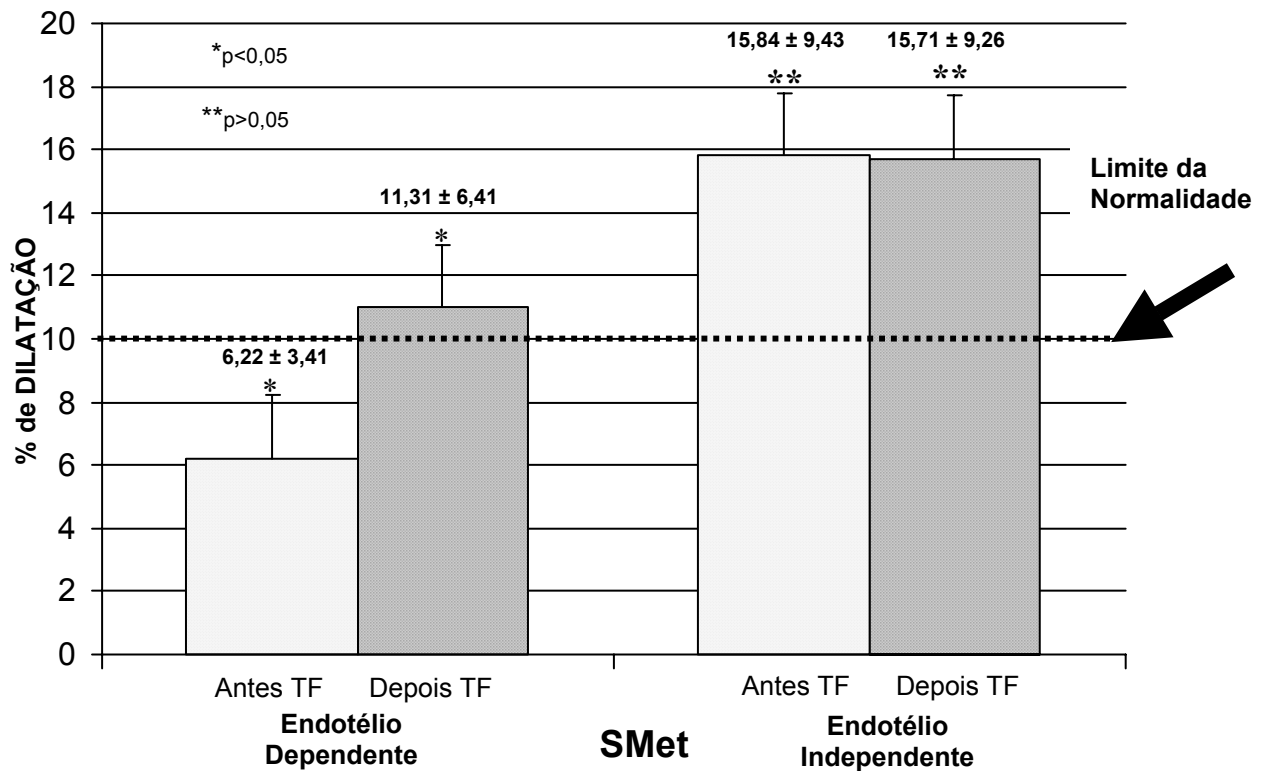


Média \pm DP das concentrações de PCRus em g/L dos pacientes com SMet controle sem TF, início e final do protocolo, dos pacientes SMet nas situações Antes e Depois do TF e dos participantes normais controle.

Figura 14 Valores de concentração de PCRus de pacientes com SMet antes e depois do TF e de normais controle

Os resultados dos Testes de Reatividade Vascular (Figura 15) mostraram que a porcentagem de Dilatação Arterial Endotélio Dependente dos pacientes com SMet encontrava-se com valores inferiores à porcentagem mínima de dilatação arterial considerada Normal (10%), diferença esta que desapareceu com o TF. ($6,22\% \pm 3,41$ vs $11,31\% \pm 6,41$, SMet antes TF vs SMet depois TF respectivamente, $p < 0,05$). A reatividade vascular endotélio independente, que já se encontrava num valor acima do mínimo considerado normal, não se modificou com o TF ($15,84\% \pm 9,43$ vs $15,71\% \pm 9,26$ SMet antes TF vs SMet depois TF respectivamente, $p > 0,05$).

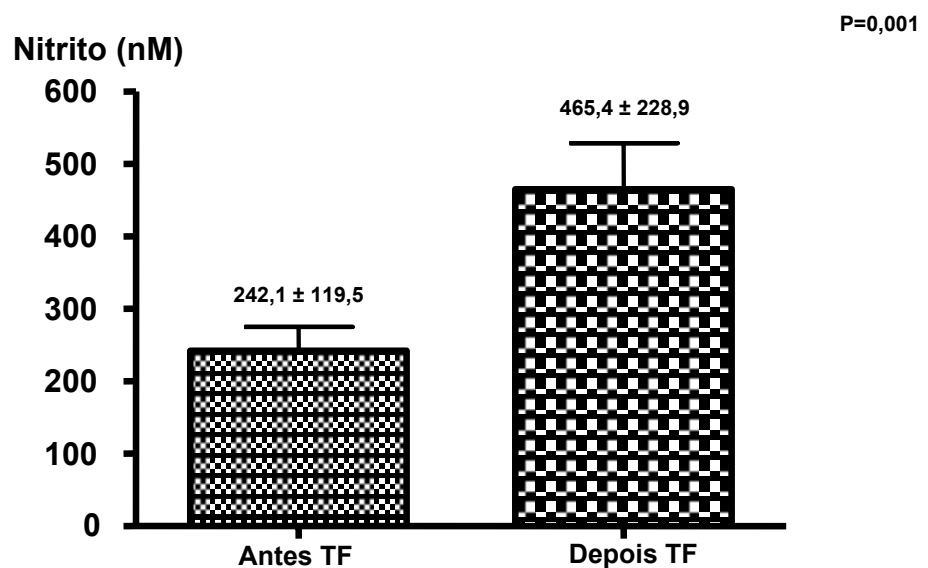
Estes dados indicam que apesar dos pacientes portadores de SMet possuírem reatividade muscular vascular intrínseca preservada, possuíam uma nítida disfunção endotelial, que melhorou significativamente com o TF.



Média ± DP dos percentuais de dilatação vascular endotélio dependente e independente. O TF melhorou significativamente somente a reatividade vascular endotélio dependente.

Figura 15. Reatividade Vascular Endotélio Dependente e Independente de Pacientes com SMet antes e depois do TF

Como outra forma de análise indireta de funcionabilidade endotelial, o Nitrito sanguíneo dos pacientes portadores de SMet que realizaram exercícios foi quantificado antes e depois do TF. (Figura 16)



Média \pm DP das concentrações de Nitrito no sangue total (nM) dos pacientes com SMet antes e depois do TF.

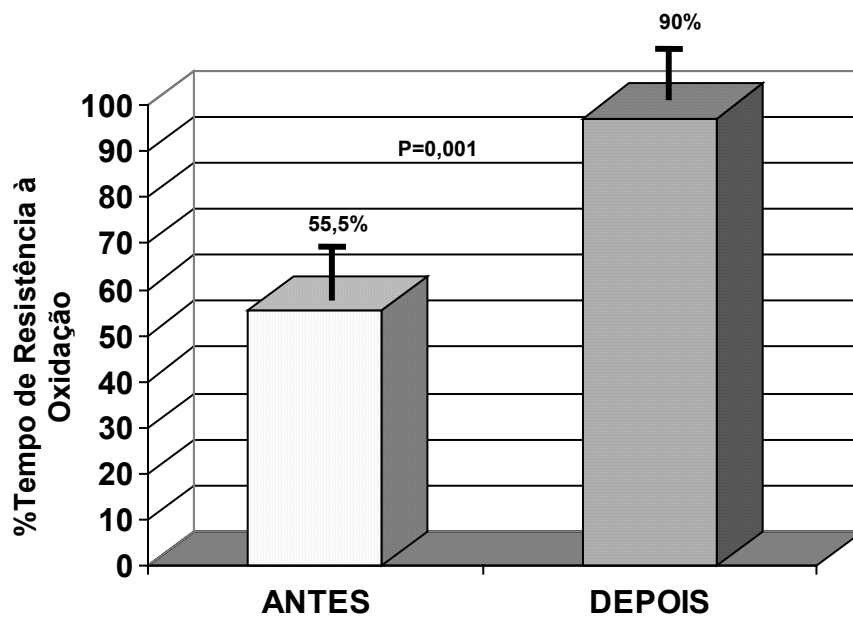
Figura 16 - Aumento do Nitrito no Sangue Total dos pacientes SMet-TF Antes(A) e Depois(D) do TF

Observa-se que o treinamento proporcionou um aumento das concentrações de Nitrito no sangue Total de aproximadamente 44 % (Média \pm DP = 242.1 \pm 119.5, 465.4 \pm 228.9 η mol Antes e Após o TF respectivamente; p = 0.01).

Neste estudo foi também avaliado a suscetibilidade das partículas de LDL, antes e após o treinamento, à oxidação "*in vitro*" que foi determinada pelo percentual do tempo de resistência da LDL à oxidação pelo CuSO₄ (Figura 17)

Os dados revelam que as partículas de LDL passaram a ter uma maior resistência à oxidação, percentualmente muito significativa, após o

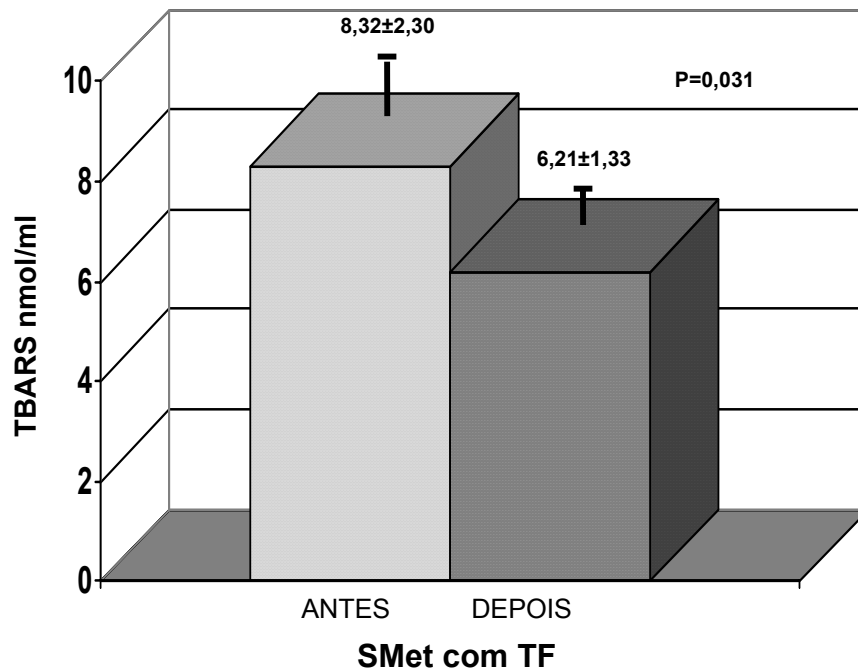
treinamento físico (55,5% vs 90% antes e depois TF respectivamente, $p=0,001$).



Porcentagem do retardo da oxidação de LDL dos pacientes com SMet que realizaram o TF nas situações Antes e Depois de completarem o treinamento.

Figura 17 - Porcentagem da alteração do Tempo de Retardo à Oxidação do LDL nos pacientes SME-TF Antes e Depois do TF

Interessante notar que o aumento da resistência da LDL à oxidação foi acompanhada de redução de TBARS, indicativa de peroxidação lipídica, dos pacientes SMet após o TF ($8,32 \pm 2,30$ vs $6,21 \pm 1,33$ nmol/mL, respectivamente antes e depois TF, $p=0,031$) (Figura 18).



Média \pm DP da quantidade de TBARS em nmol/ml obtidos do Plasma de pacientes SMet Antes e Após TF.

Figura 18 - Concentração de TBARS plasmáticos

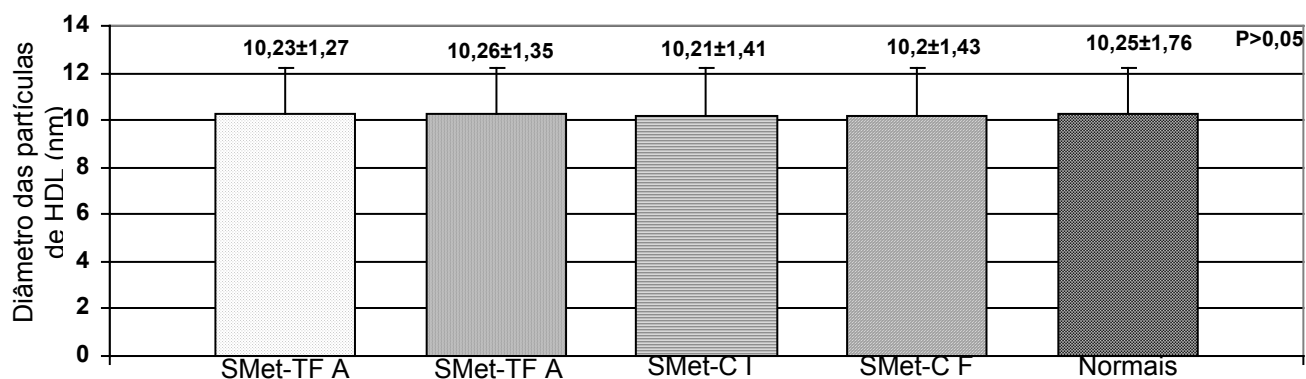
Na análise da composição das partículas de LDL dos pacientes com SMet-TF, antes e após o TF, observamos que não houve alteração da quantidade de proteína, colesterol total ao TF. Entretanto houve redução da concentração de Triglicérides (-13,92%) contido nas partículas assim como de apoB (-16,16%), que pode indicar mudanças das características das partículas de LDL de pequenas e densas para partículas maiores. (Tabela 13).

Tabela 13 – Alteração percentual da composição do LDL dos Pacientes com SMet-TF Antes e Depois do TF

	% alteração LDL Antes/Depois TF	
Proteína	+1,20%	p>0,05
CT	-6,80%	p>0,05
PL	+0,96%	p>0,05
CL	+1,07%	p>0,05
CE	-6,72%	p>0,05
ApoB	-16,16%	P<0,05
TG	-13,92%	p<0,05

CE : colesterol ester; PL : fosfolípides; TG : triglicérides;
CL : colesterol livre ; CT : colesterol total

Neste estudo foi analisado o diâmetro médio das partículas de HDL por varredura a Laser. Não se encontrou diferenças significativas de tamanho das partículas de HDL em todos os grupos, (Figura 19).



Média ± DP dos diâmetros (nm) das partículas de HDL dos pacientes SMet-TF Antes (SMet-TF A) e Depois (SMet-TF D) do TF, pacientes SMet-Controle sem TF no início (SMet-C I) e fim (SMet- CF) do protocolo e dos participantes Normais

Figura 19 - Diâmetro das partículas de HDL

Analisando-se a composição das subfrações da HDL dos pacientes SMet que fizeram o TF (Tabela 14) podemos observar que somente houve redução significativa percentual, após o TF, no conteúdo de triglicérides (-11,26%) na subfração HDL3b e de triglicérides (-15,14%) e colesterol total (-13,16%) da subfração HDL3c.

Tabela 14 - Diferença percentual da composição das subfrações de HDL de pacientes com SMet antes(A) e depois(D) TF

	HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
	A/D	A/D	A/D	A/D	A/D
PT	+1,22%	+1,83%	+6,41%	+1,76%	+1,18%
CT	+1,42%	+1,62%	+6,14	+0,92%	-13,16% #
TG	-0,11%	+0,1%	-4,85%	-11,26% #	-15,14% # # p<0,05

Também se analisou a Transferência de Lipídeos (Tabela 15) de um meio artificial contendo Triglicérides, Colesterol Ester, Colesterol Livre e Fosfolípidos marcados radioativamente para partículas de HDL dos pacientes com SMet, antes e depois do TF, e se comparou com a transferência para a HDL obtida dos indivíduos normais controle.

Tabela 15 – Comparação do percentual de Transferência Lipídica para a partícula HDL de pacientes SMet antes(A) e depois(D) TF com Controles(C)

Transferência Lipídica (%)	Grupos * p< 0,05 e # p>0,05		
	SMet Antes(A) TF	SMet Depois(D) TF	Normais Controle(C)
³ H-CE	3,36±1,28 #	3,82±0.64 #	4,36±0.80 #
¹⁴ C-PL	26,36±3,31#	25,69±1,12 #	26,73±2,25 #
³ H-TG	3,79±0.63 #	3,99±1,21 #	6,72±1,08 #
¹⁴ C-C	7,71±1,60 *	8,60±0.82 *	8,92±1.40 #
		A vs D p=0,03	D vs C p>0,05

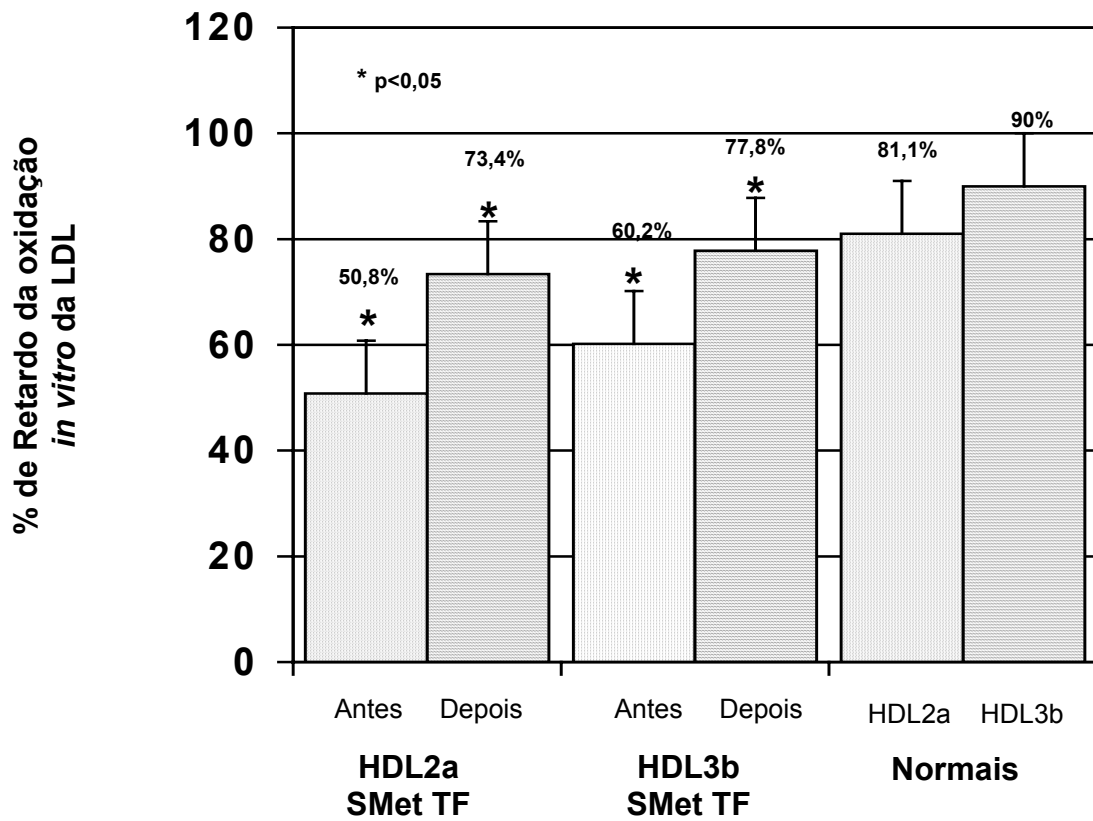
CE : colesterol ester; PL : fosfolípidos; TG : triglicérides; C : colesterol

Nota-se que houve aumento significativo do percentual de transferência de colesterol livre para a HDL nos pacientes SMet após o TF, conseguindo atingir valores semelhantes aos obtidos pelos indivíduos normais controle.

As propriedades antioxidativas das HDL (antes e depois) TF foram avaliadas pela variação do tempo de resistência à oxidação *in vitro* da LDL, pertencente a indivíduo normal, na presença de subfrações de HDL. (Figura 20)

Analisamos o incremento percentual da resistência à oxidação da LDL quando acrescentamos, de forma isolada, subfrações de HDL2a e HDL3b obtidas por ultracentrifugação dos pacientes SMet nas situações antes e depois do TF.

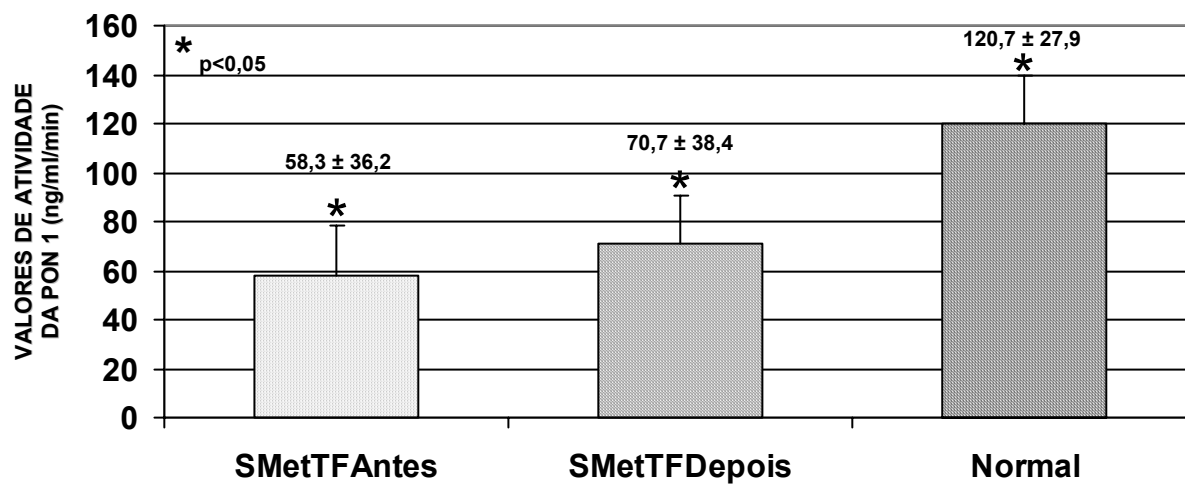
Houve aumento significativo na capacidade de proteção antioxidativa das subfrações 2a e 3b de HDL do grupo SMet-TF (50,8% vs 73,4% com HDL2a antes e depois TF e 60,2% vs 77,8% com HDL3b antes e depois TF). Entretanto, este aumento percentual de retardo à oxidação foi inferior aos conseguidos pelas subfrações de HDL obtidas dos indivíduos normais de controle (81,1% com HDL2a e 90% com HDL3b).



Porcentagem do retardo da oxidação de LDL de indivíduo normal sob a ação de HDL2a e HDL3b tanto dos pacientes com SMet nas situações Antes e Depois do TF como dos participantes normais controle.

Figura 20 - Influência das subfrações de HDL no Retardo à Oxidação *in vitro* da LDL dos Pacientes com SMet Antes e Depois do TF

A atividade da Paraoxonase 1 (PON1) foi avaliada no soro dos participantes, Normais e portadores de SMet antes e após TF (Figura 21). O TF aumentou significativamente a atividade da PON1 no soro dos pacientes com SMet ($58,3 \pm 36,2$ ng/ml/min antes vs $70,7 \pm 38,4$ ng/ml/min depois do TF, $p < 0,05$), níveis entretanto, inferiores aos obtidos pelos participantes normais ($120,7 \pm 27,9$ ng/ml/min, $p < 0,05$).



Média ± DP da atividade da PON1(ng/ml/min) do soro dos pacientes com SMet -TF Antes(A) e Depois (D) do TF e dos participantes Normais

Figura 21 - Atividade da PON-1

4. DISCUSSÃO

A oxidação das partículas de LDL é considerada ponto fundamental do processo aterosclerótico iniciando o processo inflamatório, característico desta doença, e que culmina com o acúmulo de colesterol esterificado e formação de células espumosas na parede arterial. Além da composição estrutural e dos níveis sanguíneos, o balanço entre os vários fatores pró e antioxidantes plasmáticos e teciduais é determinante para minimizar a alteração estrutural oxidativa das LDL.^{31, 116}

Para fins de diagnóstico clínico da SMet apenas as concentrações séricas elevadas de TG e baixas de HDL fazem parte dos parâmetros sugeridos por várias diretrizes entretanto, as LDL com características pequenas e densas é apontada como importante fator participante da doença.

Vários estudos apontam que a diminuição da densidade das LDLs, que indica tamanho das partículas, e não a mudança nos seus níveis séricos, é melhor preditor de doença isquêmica cardíaca.^{117,118} Vários pesquisadores tem sugerido que a concentração sanguínea de apoproteína B seria portanto mais importante que os próprios níveis de LDL na caracterização do risco cardíaco por traduzirem melhor a quantidade de partículas existentes.^{119, 120}

O exercício físico praticado com longa duração e intensidade adequada produz modificações no perfil lipídico promovendo um aumento no metabolismo dos triglicérides e diminuindo sua concentração sanguínea.

Com isto, ocorre uma redução da participação dos triglicérides nas lipoproteínas ocasionando aumento no tamanho destas partículas. Os exercícios realizados numa intensidade moderada podem modular a distribuição das subfrações de LDL existindo estudos que mostraram uma redução de até 62% das partículas pequenas e densas de LDL, mas sem alterar as subclasses de LDL grandes e boiantes.⁶⁸ O exercício físico também promove uma discreta elevação do HDL o que, em conjunto com as outras alterações lipídicas, produz um efeito francamente antiaterogênico.^{121,}

122

Entretanto, os exercícios de grande intensidade realizados de forma aguda parecem não compartilhar destas propriedades pois, contrariamente dos efeitos benéficos da atividade física aeróbia regular, o exercício aeróbio intenso e agudo pode aumentar a geração de radicais livres nos músculos superando as defesas antioxidantes, normalmente presentes, e induzir o estresse oxidativo.^{123,124}

Reforçando este dado observou-se que em competições envolvendo esforços extenuantes o tamanho das partículas de LDL permaneceu inalterado, indicando a importância da intensidade e duração do exercício

125,126

O treinamento crônico e regular por outro lado pode estimular o aparecimento de enzimas antioxidantes tanto nos tecidos musculares envolvidos ativamente no exercício^{123,127,128} como na circulação.¹²⁹ Tem sido verificado maior rendimento metabólico das células musculares como resultado de adaptações estruturais e enzimáticas através do aumento tanto

no tamanho e número de mitocôndrias assim como das enzimas antioxidantes.¹³⁰

Laurindo e cols²⁷ mostraram que a disfunção endotelial é uma disfunção da sinalização redox, ponto fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose. O exercício físico é uma das condições que exerce influência sobre o balanço entre estresse oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante. Durante os exercícios físicos, ocorrem várias reações químicas que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Para proteger os tecidos contra os danos causados pelas EROS produzidos durante o exercício físico as enzimas antioxidantes como super óxido dismutase, catalase e glutathione parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades nos tecidos e órgãos de indivíduos treinados. Isso ocorre principalmente em treinamentos do tipo de *endurance*.¹³¹ Diversos estudos relatam que atletas treinados têm maiores níveis de resistência da LDL à oxidação in vitro em comparação a controles sedentários.^{132,133,134}

Um dos biomarcadores do estresse oxidativo são as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). No presente estudo houve marcante queda dos níveis plasmáticos das TBARS nos pacientes com SMet que realizaram o TF, indicando melhora no balanço oxidação/antioxidação com o tempo e tipo de treinamento físico realizado.

Experimentos cinéticos com isótopos radioativos realizados no Laboratório de Lípidos do InCor mostrou de forma incontestável que o exercício físico promove um clareamento plasmático de partículas de LDL mais rápido indicando que provavelmente houve recuperação da conformação e

composição estruturais destas partículas com intensidade suficiente a serem mais reconhecíveis por seus receptores clareadores hepáticos específicos.

135,136

Neste estudo, avaliou-se a influência do treinamento físico aeróbio de curta duração sobre o perfil oxidativo das partículas de LDL e a capacidade antioxidante das subfrações de HDL de pacientes portadores de Síndrome Metabólica, frente a um programa de exercício físico aeróbico.

O aumento da concentração das partículas de HDL geralmente está muito relacionado com a frequência e intensidade do exercício aeróbio.^{121,137} Isto decorre do estímulo à lipoproteína lipase, considerando-se que a geração de partículas de HDL é um processo inerente ao metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides¹³⁸ bem como da redução no catabolismo da apolipoproteína A-I e diminuição da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP).¹³⁹

Normalmente a FC utilizada como alvo num treinamento efetivo ocorre em torno de 60% do VO₂ máximo. Essa faixa de percentual coincide com o LA e o ponto de compensação respiratória (PCR).¹⁴⁰ É importante salientar, que a intensidade mínima mais citada em relação à captação de oxigênio que provoca efeito fisiológico de treino é a partir de 50% do VO₂ máximo.

Pelos resultados deste estudo, observamos que todos os participantes do programa de exercício apresentaram melhora no seu condicionamento físico, traduzido pelo aumento no VO₂ máximo que atingiram. Isto significa boa resposta e eficácia do esforço aeróbio que foi

implementado por 12 semanas seguidas sem intervalos, indicando claramente que se atingiu a intensidade do esforço desejada.

Não houve mudanças no peso dos participantes, e conseqüentemente no IMC. Entretanto, houve diminuição significativa da circunferência abdominal. Ressalta-se que a medida da circunferência abdominal, por ser um dos índices antropométricos mais representativos da gordura intra-abdominal e por ser tanto de aferição simples como reprodutível, é uma das medidas mais recomendada para o rastreamento diagnóstico de SMet.¹⁴¹

Uma das explicações prováveis destes resultados é que, diferentemente de estudos similares, não foi introduzida nenhuma dieta específica para os pacientes além do aconselhamento dietético inerente a esta doença, como restrição do excesso de carboidratos e gorduras saturadas. Isto pode ter contribuído pela não modificação da composição corporal de forma significativa pelo treinamento físico. Corroborando estes dados, alguns estudos também observaram que indivíduos submetidos a condicionamento físico intenso, porém sem restrição calórica, apresentavam redução da circunferência de cintura e adiposidade visceral independentemente de mudanças no IMC.¹⁴²

Isto pode indicar a importância da implementação de uma dieta restritiva e balanceada concomitante aos exercícios aeróbios quando o interesse básico é a diminuição de peso, o que não foi o objetivo principal desta pesquisa.

O grau de oxidação da LDL reflete o equilíbrio de seus muitos elementos pro-oxidantes e anti-oxidantes endógenos, assim como do tamanho da partícula,^{143,144} da sua composição e da concentração na sua superfície de vitaminas e outras substâncias antioxidantes.¹⁴⁵ Recentemente, Benitez e outros¹⁴⁶ relataram que mudanças na resistência oxidativa das partículas de LDL depois de exercício aeróbio está relacionado com o aumento circulante de ácidos graxos não-esterificados associados a uma maior mobilização de triglicérides do tecido adiposo para suprimento de energia.

Sabe-se que em pacientes diabéticos, o exercício físico ocasiona um deslocamento das partículas de LDL do tipo B, menores, mais densas e francamente aterogênicas, para o tipo A maiores e mais leves. Estas alterações parecem estar relacionadas com a quantidade de triglicérides nas partículas de lipoproteínas.⁷¹ Alguns estudos também sugerem que o efeito do exercício no tamanho de LDL depende basicamente de qual é a partícula predominante antes do programa de exercício.¹⁴⁷

Pelos resultados obtidos no presente estudo, podemos observar que o grau de suscetibilidade das partículas de LDL à oxidação reduziu significativamente após o TF, sugerindo fortemente que houve modificações importantes na qualidade funcional destas partículas. Interessante de se notar é que ao compararmos os níveis de LDL sérico, não observamos mudanças significativas na sua concentração. Entretanto, houve certa redução dos níveis de triglicérides séricos e, muito importante, na

composição das partículas de LDL com diminuição de triglicérides e a quantidade de apoB..

Isto reforça a idéia que, neste tipo de paciente e neste protocolo de exercícios, mais que a quantidade, a qualidade das partículas de lipoproteínas está beneficiada desde os primeiros meses de TF, fato este caracterizado pela diminuição significativa da concentração de apoproteína B dos pacientes com SMet após o protocolo de exercício, indicando aumento da quantidade de LDL maiores e menos densas.

Alguns estudos populacionais indicam que, independentemente dos valores de LDL, indivíduos que possuem concentrações elevadas de HDL apresentam risco reduzido de desenvolvimento de DAC. Este efeito está relacionado com a participação da HDL tanto no transporte reverso de colesterol assim como com suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antiagregantes e vasodilatadoras.^{44,148}

Entretanto, existem indicações de que, além da quantidade, a qualidade da partícula de HDL relacionada com suas apoproteínas é fundamental. Exemplo interessante pode ser observado em indivíduos de uma pequena comunidade italiana que, apesar de apresentarem níveis médios de HDL extremamente baixos, possuem reduzida incidência de doenças ateroscleróticas. Nesta população foi determinado que a qualidade funcional da apoproteína da HDL, denominada de apoA1 Milano, era causa do fator protetor. Estudo randomizado bem controlado comprovou que a administração da apoA-I Milano recombinante promoveu regressão significativa da aterosclerose coronária humana após 5 semanas de

tratamento, reforçando a importância de explorarmos a qualidade funcional da partícula de HDL.¹⁴⁹

As partículas de HDL são formadas por subfrações que são heterogêneas em sua atividade antioxidante, provavelmente pela diversidade de composição lipídica assim como pela distribuição não uniforme das suas apolipoproteínas e enzimas que possuem propriedades antioxidantes.^{55,150}

Algumas pesquisas mostraram que as partículas menores das subfrações do HDL possuíam maior atividade antioxidante. Isto se deve provavelmente pelo sinergismo na inativação de lipídios oxidados por mecanismos enzimáticos, como os ocasionados pelas enzimas PON, LCAT e PAF-AH, sendo que grande parte do poder antioxidante das partículas de HDL vem da enzima Paraoxonase que está aderida às suas apoproteínas.^{151,152}

Os resultados do presente estudo mostraram que os pacientes portadores de SMet apresentavam baixa atividade de PON1. Com o TF houve aumento da atividade enzimática nos pacientes que realizaram o treinamento porém, ainda assim permaneceram em níveis bem abaixo dos valores obtidos pelos normais controle. Como não houve aumento significativo dos níveis de HDL total no sangue isto pode indicar que houve aumento da atividade da enzima e ganho funcional em algumas das subfrações da HDL. Também é importante lembrar que o nível de atividade da PON1 pode estar de alguma forma relacionada com polimorfismos¹⁵³ e estados de resistência à insulina.^{154,155,156}

A função endotelial vascular é essencial para a manutenção da homeostase da parede vascular e para o controle vasomotor. Estas funções são devido à produção de numerosos autacóides, dos quais o óxido nítrico (NO) é o mais estudado. Em estudos animais e humanos se mostrou que o treinamento físico aeróbio foi essencial para aumentar a vasodilatação endotélio-dependente. Particularmente nos seres humanos, a extensão da melhora da função endotelial depende principalmente da massa muscular sujeita ao treinamento.¹⁵⁷ Assim, exercícios aeróbios envolvendo grandes massas musculares, como as das pernas, mostraram ser muito eficazes no aumento da biodisponibilidade do NO. Estes aspectos foram mais evidentes em indivíduos já com disfunção endotelial prévia onde se observou que o treinamento físico pode melhorar a função endotelial pelo aumento da expressão da eNOSintase.¹⁵⁸ Infelizmente, o aumento da biodisponibilidade do NO se dissipa dentro de poucas semanas da cessação do treinamento.¹⁵⁹

Para uma percepção da biodisponibilidade do NO, é necessário um método que avalie os níveis de nitritos e nitratos sanguíneos. No estudo atual foi aplicada uma metodologia especial de dosagem de Nitrito para esta análise e estes testes revelaram um aumento significativo do Nitrito no sangue total. Interessante é que este aumento já ocorreu com este pouco tempo de treinamento reforçando a compreensão dos benefícios do exercício desde suas fases iniciais.

As metodologias atualmente utilizadas para avaliar a função endotelial em humanos envolvem procedimentos diretos invasivos e observação

indireta não invasiva. Os procedimentos invasivos, com infusões arteriais de substâncias vasoativas, tem limitações quando o estudo envolve muitos indivíduos. Nestes casos é de extrema eficácia o procedimento indireto, pela análise da reatividade vascular observada por método ecocardiográfico, eco *Doppler* vascular de alta resolução, que apresenta boa reprodutibilidade e sensibilidade.

Os resultados da melhora da reatividade vascular endotélio dependente obtidos pelos pacientes ao treinamento físico foram extremamente significativos. Os pacientes apresentaram nítida disfunção endotelial ao iniciarem o protocolo e alcançaram respostas reativas vasculares endotélio dependente dentro dos padrões reconhecidos como normais para esta metodologia, mostrando uma recuperação nítida da função endotelial.

Como esta recuperação foi tão eficaz, e em tão pouco tempo de treinamento, pode-se questionar se não haveria um outro mecanismo atuando em sinergismo com o exercício.

Vários estudos mostram uma atuação direta das partículas de HDL no endotélio indicando a possibilidade de que elas possuam efeitos endotélio-protetores por mecanismos de rápido aumento da biodisponibilidade de NO pela ativação da eNOSintase.⁸⁸ Estes dados nos fazem supor que, em indivíduos com baixos níveis de HDL, um programa de exercícios físicos possa melhorar a função endotelial por dupla ação, ou seja, melhora pela força de cisalhamento que o fluxo sanguíneo exerce sobre a parede do vaso sanguíneo e pela melhora funcional das partículas de HDL, ambas agindo na

ativação da enzima eNOSintase com conseqüente aumento na produção e oferta de NO.

Como provável exemplo da ação direta da HDL no endotélio são os interessantes resultados obtidos por Benjó e Da Luz⁹⁵ em pacientes com HDL baixo, onde a administração de ácido nicotínico não aumentou os níveis de HDL. Entretanto, observou-se importante melhora na reatividade vascular endotélio-dependente o que pode indicar que, apesar do insucesso no aumento da concentração de HDL, tenha havido na realidade benefício funcional da HDL o que levou a melhora funcional endotelial e a maior disponibilidade de NO.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo apontam para uma melhora funcional das partículas de lipoproteínas, independente de mudanças quantitativas, em curto período de treinamento físico. Isto sugere que a melhora funcional das lipoproteínas, neste tipo de treinamento, pode preceder as alterações da concentração plasmática das mesmas, que sabidamente ocorrem com exercícios realizados em longos períodos.

A melhora da função endotelial também indicou os benefícios precoces do exercício físico.

6. ANEXOS

TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

- TCLE para Portadores de Síndrome Metabólica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO:CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .

Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com Síndrome Metabólica

2. PESQUISADOR: Antonio Casella Filho

CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20746

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- 1- Você está sendo convidado a participar, de forma completamente voluntária, de um estudo que tem por objetivo conhecer as alterações que o exercício promove no sangue, no chamado colesterol bom, assim como nos vasos de pacientes que tem um conjunto de doenças que provocam aterosclerose assim como infarto do coração, chamada de Síndrome Metabólica.
- 2- Este é somente um convite e de forma alguma você está obrigado a participar.
- 3- Caso você aceite, você deverá comparecer ao InCor, por sua própria conta, 3 vezes por semana durante 4 meses no mínimo, onde você realizará exercícios numa bicicleta, que não sai do lugar, e quando você poderá ficar um pouco cansado com este exercício. Neste período também serão realizados tanto exame de ultra-som de vaso do seu braço, que é como fazer ultra-som para ver bebê na barriga de mulher grávida só que é para ver o vaso do seu braço, e exames de urina assim como serão colhidos amostras de sangue do seu braço para exames laboratoriais.
- 4- O ultra-som do vaso do braço é realizado em duas fases: na primeira fase é colocado a braçadeira de pano do aparelho de medir a pressão arterial em volta do seu braço e ele será apertado por 5 minutos, como se estivesse sendo medido sua pressão arterial, só que de maneira um pouco mais prolongada. Na segunda fase será novamente realizado o ultra-som do vaso do seu braço após você colocar um comprimido embaixo da sua língua, chamado isordil, e você poderá sentir um pouco de tontura e, se isto ocorrer, as suas pernas serão erguidas para o alto para você melhorar. Também você poderá ter um pouco de dor de cabeça que, entretanto é aliviada com analgésico.
- 5- É importante você saber que as informações que forem obtidas com esta pesquisa poderão ajudar no futuro a melhorar a assistência médica aos pacientes portadores de Síndrome Metabólica, que é a doença que você tem.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O paciente terá acesso, no momento que desejar, à todas as informações sobre a pesquisa incluindo sobre os exames, os riscos e benefícios que terá, para não ter dúvidas alguma.

Como a participação é voluntária o paciente tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem que isto traga qualquer transtorno, sendo assistido pela

equipe de médicos da Unidade de Aterosclerose do InCor-HC FMUSP durante todo o decorrer da pesquisa.

As informações obtidas serão estritamente utilizadas apenas para fins científicos e nenhuma informação individual será divulgada sendo que os resultados somente serão apresentados em eventos e publicações científicas.

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Qualquer informação que necessitar, e quando necessitar, será fornecida por meio do telefone 30695352 ou pessoalmente na Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44 – São Paulo-SP

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(Antonio Casella Filho)

- TCLE para Participantes Normais servindo como Controle

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

3. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA .

Influência do exercício físico nas lipoproteínas e no endotélio de pacientes com Síndrome Metabólica

4. PESQUISADOR: Antonio Casella Filho

CARGO/FUNÇÃO: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20746

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

- 6- Você está sendo convidado a participar, de forma completamente voluntária, como uma pessoa que possa servir de Controle Normal para um estudo que tem por objetivo conhecer as alterações que o exercício promove no sangue, no chamado colesterol bom, assim como nos vasos de pacientes que tem um conjunto de doenças que provocam aterosclerose assim como infarto do coração, chamada de Síndrome Metabólica.
- 7- Este é somente um convite e de forma alguma você está obrigado a participar.
- 8- Caso você aceite, você deverá comparecer ao InCor, por sua própria conta, 3 vezes por semana durante 4 meses no mínimo, onde você realizará exercícios numa bicicleta, que não sai do lugar, e quando você poderá ficar um pouco cansado com este exercício. Neste período também serão realizados tanto exame de ultra-som de vaso do seu braço, que é como fazer ultra-som para ver bebê na barriga de mulher grávida só que é para ver o vaso do seu braço, e exames de urina assim como serão colhidos amostras de sangue do seu braço para exames laboratoriais.
- 9- O ultra-som do vaso do braço é realizado em duas fases: na primeira fase é colocado a braçadeira de pano do aparelho de medir a pressão arterial em volta do seu braço e ele será apertado por 5 minutos, como se estivesse sendo medido sua pressão arterial, só que de maneira um pouco mais prolongada. Na segunda fase será novamente realizado o ultra-som do vaso do seu braço após você colocar um comprimido embaixo da sua língua, chamado isordil, e você poderá sentir um pouco de tontura e, se isto ocorrer, as suas pernas serão erguidas para o alto para você melhorar. Também você poderá ter um pouco de dor de cabeça que, entretanto é aliviada com analgésico.
- 10- É importante você saber que as informações que forem obtidas com esta pesquisa poderão ajudar no futuro a melhorar a assistência médica aos pacientes portadores de Síndrome Metabólica.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

O paciente terá acesso, no momento que desejar, à todas as informações sobre a pesquisa incluindo sobre os exames, os riscos e benefícios que terá, para não ter dúvidas alguma.

Como a participação é voluntária o paciente tem o direito de interrompê-la em qualquer momento, sem que isto traga qualquer transtorno, sendo assistido pela

equipe de médicos da Unidade de Aterosclerose do InCor-HC FMUSP durante todo o decorrer da pesquisa.

As informações obtidas serão estritamente utilizadas apenas para fins científicos e nenhuma informação individual será divulgada sendo que os resultados somente serão apresentados em eventos e publicações científicas.

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Qualquer informação que necessitar, e quando necessitar, será fornecida por meio do telefone 30695352 ou pessoalmente na Unidade Clínica de Aterosclerose-InCor na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 44 – São Paulo-SP

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(Antonio Casella Filho)

7. REFERÊNCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
2. Da Luz PL, Uint L. O endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. In: *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. Cap. 10; p.133-160.
3. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90(10C):40L-8.
4. Vita JA, Keaney Jr. JF. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation*. 2002;106(6):640-2.
5. Irene MS. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000;321:405-12.
6. Sonnenberg G, Krakow G, Kissebah A. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res*. 2004;12(2):180-6.
7. Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med*. 1999;159:1104-9.
8. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Volume 84, Suplemento I, Abril 2005.

9. Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol. *JAMA*. 2001;285:2486-97.
10. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735-52.
11. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-62.
12. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the Metabolic Syndrome. *Diabetes*. 2004;53:2087.
13. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 1999;38(2):202-6.
14. Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1987;36:54-9.
15. Brunzell JD. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. In: Eckel R, editor. *Obesity: Mechanisms and clinical management*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.378-98.
16. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 1998;81:18B-25B.

17. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al, for the American Heart Association and National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004;109: 433-8.
18. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-9.
19. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heartdisease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatinin Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339:1349-57.
20. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7-22.
21. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres J-P. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. 1997;95(1):69-75.
22. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. 1990;83:59-67.

23. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3542-56.
24. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA.* 1988;260:1917-21.
25. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48:125-33.
26. de Graaf J, Hak Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:298-306.
27. Laurindo FRM Desequilíbrio Redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. In: Endotélio & doenças cardiovasculares. São Paulo; Atheneu; 2003. Cap. 9; p.115-132.
28. La Belle M, Krauss RM. Differences in carbohydrate content of low density lipoproteins associated with low density lipoprotein subclass patterns. *J Lipid Res.* 1990;31:1577-88.
29. Darley-Usmar V, Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmac Res.* 1996;13:649-62.
30. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J.* 2001;15:2073-84.

31. Navab M, Hama S, Reddy S, Ng C, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:363-72.
32. Li Z, McNamara JR, Ordovas JM, Schaefer EJ. Analysis of high density lipoproteins by a modified gradient gel electrophoresis method. *J Lipid Res*. 1994;35:1698-711.
33. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J*. 1987;113:589-97.
34. Asztalos BF. HDL Atherosclerosis Treatment Study: High-density lipoprotein metabolism and progression of atherosclerosis: new insights from the HDL Atherosclerosis Treatment Study. *Curr Opin Cardiol*. 2004;19:385-391.
35. Warden CH, Hedrick CC, Qiao JH, et al. Atherosclerosis in transgenic mice overexpressing apolipoprotein A-I. *Science*. 1993;261:469-72.
36. Amouyel P, Isorez D, Bard JM, et al. Parental history of early myocardial infarction is associated with decreased levels of lipoparticle AI in adolescents. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1640-4.
37. Asztalos BF, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Cox CE, Batista MC, Schaefer EJ. HDL subpopulation profile and CHD-prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2181-7.
38. Barter P; Kastelein J; Nunn A, et al. High density lipoproteins and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003;168:195-211.

39. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:6917.
40. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1052-62.
41. Tall AR, Wang N, Mucksavage P. Is it time to modify the reverse cholesterol transport model? *J Clin Invest*. 2001;108(9):1273-5.
42. Nofer JR. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002;161:1-16.
43. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161:245-54.
44. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95:764-72.
45. Navab M, Imes SS, Hama SY, Hough JP, Ross LA, Bork RW, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1991;88(6):2039-46.
46. Ashby DT, Rye K-A, Clay MA. Factors Influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1450-5.
47. Watson AD, Berliner, JA, Hama SY, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995;96:2882-91.

48. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(9):1304-16.
49. Vohl MC, Neville T. A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry*. 1999;38,5976-81.
50. Mertens A. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage homing and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation*. 2003;107(12):1640-6.
51. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, et al. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol*. 1997;112:265-8.
52. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein and preserves its functions. *J Clin Invest*. 1998;101:1581-90.
53. Mertens A. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J*. 2001;15:2073-84.
54. Pasdar A, Ross-Adams H, Cumming A, Cheung J, Whalley L, St Clair D, MacLeod MJ. Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Med Genet*. 2006;7:28.
55. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1881-8.

-
56. Bisgaier CL, Sackdev OP, Megna L, Glickman RM. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. *J Lipid Res.* 1985;26(1):11-25.
 57. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993;104(1-2):129-35.
 58. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, et al. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res.* 2004;95(8):789-97.
 59. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL-C metabolism, and atherogenesis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1185-8.
 60. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MS, Harper CM, Yoo J, Kim SM, Wong H, Peters AL. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia.* 2000;43:312-20.
 61. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, et al. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(35):13032-7.
 62. Hansel B, Giral P, Nobecourt E. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2004;89(10):4963-71.

63. Horowitz JF, Klein S. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:558S-63S.
64. Durstine JL, Haskell WL. Effects of exercise training on plasma lipids and lipoproteins. *Exerc Sport Sci Rev.* 1994;22:477-521.
65. Berg A, Frey I, Baumstark MW, Halle M, Keul J. Physical activity and lipoprotein lipid disorders. *Sports Med.* 1994;17:6-21.
66. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales CW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* 2002;347(19):1483-92.
67. Duncan GE, Perri MG, Theriaque DW, Hutson AD, Eckel RH, Stacpoole PW. Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults. *Diabetes Care.* 2003;26(3):557-62.
68. Lethonen A, Viikari J. Serum triglycerides and cholesterol and serum high-density lipoprotein cholesterol in highly physically active men. *Acta Med Scand.* 1978;204:111-4.
69. Yu HH, Ginsburg GS, O'Toole ML, Otvos JD, Douglas OS, Rilai N. Acute changes in serum lipids and lipoprotein subclasses in triathletes as assessed by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1945-9.
70. Sunami Y, Motoyama M, Kinoshita F, Mizooka Y, Sueta K, Matsunaga A, Sasaki J, Tanaka H, Shindo M. Effects of low-intensity aerobic training on the high density lipoprotein cholesterol concentrations in healthy elderly subjects. *Metabolism.* 1999;48:984-8.

71. Taskinen MR, Smith U. Lipid disorders in NIDDM: implications for treatment. *J Intern Med.* 1998;244:361-70.
72. Wood PD, Haskell WL, Blair SN, Williams PT, Krauss RM, Lindgren FT, Albert JJ, Ho PH, Farquhar JW. Increased exercise level and plasma lipoprotein concentrations: a one-year randomized, controlled study in sedentary middle-aged men. *Metabolism.* 1983;32:31-9.
73. Houmard JA, Bruno NJ, Bruner RK, McCammon MR, Israel RG, Barakat HA. Effects of exercise training on the chemical composition of plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;14:325-30.
74. Gorski J. Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992;70:123-31.
75. Thompson PD. Effect of prolonged exercise training without weight loss on high-density lipoprotein metabolism in overweight men. *Metabolism.* 1997;46:217-23.
76. Durstine JL, Thompson PD. Exercise in the treatment of lipid disorders. *Cardiol Clin.* 2001;19:471-88.
77. Eriksson JG. Exercise and the treatment of type 2 diabetes mellitus. An update. *J.Sports Med.* 1999;27(6):381-91.
78. Lehmann R, Engler H, Honegger R, Riesen W, Spinass GA. Alterations of lipolytic enzymes and high-density lipoprotein subfractions induced by physical activity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(1):37-44.
79. Kiens B, Lithell H, Mikines KJ, Richter EA. Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J Clin Invest.* 1989;84:1124-9.

80. Kokkinos PF, Holland C, Narayan P, Collieran JA, Dotson CO. Miles run per week and high-density lipoprotein cholesterol levels in healthy, middle-aged men. *Arch Intern Med*. 1995;155:415-20.
81. Mankowitz K, Seip R, Semenkovich CF, Daugherty A. Short-term interruption of training effects both lasting and post-prandial lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1992;95:181-9.
82. Huttunen JK. Physical activity and plasma lipids and lipoproteins. *Ann Clin Res*. 1982;34:124-9.
83. Thompson PD, Rader DJ. Does exercise increase HDL cholesterol in those who need it the most? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21(7):1097-8.
84. Ardern CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, Leon AS, Wilmore JH, Skinner JS, Rao DC, Despres JP, Rankinen T, Bouchard C. Race and sex similarities in exercise-induced changes in blood lipids and fatness. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(9):1610-5.
85. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci*. 2002;17(6):251-5.
86. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*. 2004;113(4):569-81.
87. Shaul PW, Mineo C. HDL action on the vascular wall: is the answer NO? *J Clin Invest*. 2004;113(4):509-13.
88. Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Luscher TF, Noll G. High-density lipoprotein

-
- restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 2002;105;399-402.
89. Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. *J Appl Physiol*. 1973; 35(2):236-43.
90. American Diabetes Association. Physical activity / Exercise and Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27,S1.
91. Kuvin J, Patel AR, Sidhu M, Rand WM, Sliney KA, Pandian NG, Karas RH. Relation between HDL-cholesterol and peripheral vasomotor function. *Am J Cardiol*. 2003;92:275-9.
92. Celermajer DS. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24(2):471-6.
93. Gutierrez MA, Pilon PE, Lage SG, Kopel L, Carvalho R, Furuie SS. Assessment of carotid diameter and wall thickness in ultrasound images using active contours improved by a multiresolution technique. *Proc. SPIE*. 2002;4683:248-55.
94. Coimbra SR, Lage SH, Brandizzi L, Yoshida V, Da Luz PL. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(9):1339-47.
95. Benjo AM, Maranhão RC, Coimbra S, Favarato D, Brandizzi L, Da Luz P. Accumulation of chylomicron remnants and impaired vascular reactivity occur in subjects with isolated low HDL cholesterol: effects of niacin treatment. *Atherosclerosis*. 2006;187(1):116-22.

96. Corretti M. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257-65.
97. Rumsey SC, Stucchi AF, Nicolosi RJ. Human plasma LDL cryopreserved with sucrose maintains in vivo kinetics indistinguishable from freshly isolated human LDL in cynomolgus monkeys. *J Lipid Res*. 1992;33(10):1551-6.
98. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.
99. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*. 1991;19(1):100-6.
100. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R, Marrugat J. Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5422-6.
101. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 2005;106(2):734-9.
102. Tanus-Santos JE, Desai M, Deak LR, Pezzullo JC, Abernethy DR, Flockhart DA, Freedman JE. Effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on platelet function, nitric oxide release, and interactions with estradiol. *Pharmacogenetics*. 2002;12(5):407-13.

103. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon 3rd RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. 2002;8(12):1383-9.
104. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagasaki S, Desta Z, Flockhart DA, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(8):565-70.
105. Yagi K. A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 1976;15:212-6.
106. Chung BH, Sergrist JP, Ray MJ, Brunzell JD, Hokanson JE, Krauss RM, Beaudrie K, Cone JT. Single vertical spin density gradient ultracentrifugation. *Methods Enzymol*. 1986;128:181-209.
107. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981;22(2):339-58.
108. Lima ES, Maranhão RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem*. 2004;50(6):1086-8.
109. Ginsburg G. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1982; 257(14):8216-27.
110. Roland IA, Maranhão RC. Transfer of phospholipids and cholesterol from triglyceride-rich emulsions to HDL in rats treated with alloxan, propylthiouracil or ethanol. *Braz J Med Biol Res*. 1993;26(1):109-18.

111. Stokke KT, Norum KR. Determination of lecithin: cholesterol acyltransfer in human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 1971;27(1):21-7.
112. Channon KM, Clegg RJ, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S, Durrington PN. Investigation of lipid transfer in human serum leading to the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer. *Atherosclerosis.* 1990;80(3):217-26.
113. Raveh O, Pinchuk I, Fainaru M, Lichtenberg D. Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of HDL and LDL, mutual effects. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1486-97.
114. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989; 6(1):67-75.
115. Fletcher GF, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, Froelicher VF, Leon AS, Pina IL, Rodney R, Simons-Morton DA, Williams MA, Bazzarre T. Exercise standards for testing and training: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 2001;104(14):1694-740.
116. Steinberg D, Carew TE, Fielding C, Fogelman AM, Mahley RW, Sniderman AD, Zilversmit DB. Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation.* 1989;80(3):719-23.
117. Lamarche B, Tchernof A, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, et al. Fasting insulin and apolipoprotein B levels and low-density lipoprotein particle size as risk factors for ischemic heart disease. *JAMA* 1998;279:1955-61.

-
118. Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation*. 1999;99:1959-64.
 119. Sniderman AD, Marcovina SM. Apolipoprotein A1 and B. *Clin Lab Med*. 2006;26(4):733-50.
 120. Barter PJ, Ballantyne CM, Carmena R, Castro Cabezas M, Chapman MJ, et al. Apo B versus cholesterol in estimating cardiovascular risk and in guiding therapy: report of the thirty-person/ten-country panel. *J Intern Med*. 2006;259(3):247-58.
 121. Couillard C, Despres JP, Lamarche B, Bergeron J, Gagnon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Effects of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(7):1226-32.
 122. Rauramaa R, Halonen P, Vaisanen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksass A, Berg A, Penttila IM, Rankinen T, Bouchard C. Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-year randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2004;40(12):1007-14.
 123. Jenkins RR. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr*. 1993;3:356-75.
 124. Ji LL. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:236-47.

125. Yu HH, Ginsburg GS, O'Toole ML, Otvos JD, Douglas PS, Rifai N. Acute changes in serum lipids and lipoprotein subclasses in triathletes as assessed by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1945-9.
126. Yeo S, Davidge ST. Possible beneficial effect of exercise, by reducing oxidative stress, on the incidence of preeclampsia. *J Womens Health Gen Based Med.* 2001;10:983-9.
127. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol Rev.* 1999;5:22-56.
128. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31:987-97.
129. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci. (Lond)* 1999;96:381-5.
130. Brown GA. Teaching skeletal muscle adaptations to aerobic exercise using an American Physiological Society classic paper by Dr. Philip Gollnick and colleagues. *Advan Physiol Edu.* 2006;30:113-8.
131. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:210-2.
132. Kujala UM, Ahotupa M, Vasankari T, Kaprio J, Tikkanen MJ. Low LDL oxidation in veteran endurance athletes. *Scand J Med Sci Sports.* 1996;6:303-8.

133. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M. Effects of acute prolonged exercise on-serum and LDL oxidation and antioxidant defences. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:509-13.
134. Sanchez Quesada JL, Ortega H, Payes-Romero A, Serrat-Serrat J, Gonzalez-Sastre F, Lasuncion MA, Ordonez-Llanos J. LDL from aerobically-trained subjects shows higher resistance to oxidative modification than LDL from sedentary subjects. *Atherosclerosis*. 1997;132:207-13.
135. Vinagre CGC, Ficker E, Negrão CE. Influence of exercise training on LDL metabolism and LDL oxidative process. *J Eur Atheros Soc*. 2002;(suppl) 3:231.
136. Roberts CK, Carey NG, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol*. 2006;101:1727-32.
137. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales CW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 2002;347(19):1483-92.
138. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 1999;38(2):202-6.
139. Ferguson MA, Alderson NL, Trost SG, Essig DA, Burke JR, Durstine JL. Effects of four different single exercise sessions on lipids, lipoproteins, and lipoprotein lipase. *J Appl Physiol*. 1998;85(3):1169-74.

140. Shephard RJ. Intensity, duration and frequency of exercise as determinants of the response to a training regime. *Int Z Angew Physiol.* 1968;26(3):272-8.
141. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body mass index, waist circumference, and health risk. *Arch Intern Med.* 2002;162:2074-79.
142. Wong SL, Katzmarzyk P, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Cardiorespiratory fitness is associated with lower abdominal fat independent of body mass index. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(2):286-91.
143. De Graaf J, Hak Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:298-306.
144. Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med.* 1993;94:350-6.
145. Tribble DL. Lipoprotein oxidation in dyslipidemia: insights into general mechanisms affecting lipoprotein oxidative behavior. *Curr Opin Lipidol.* 1995;6:196-208.
146. Benitez S, Sanchez-Quesada JL, Lucero L, Arcelus R, Ribas V, Jorba O, Castellvi A, Alonso E, Blanco-Vaca F, Ordonez-Llanos J. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids. *Atherosclerosis.* 2002;160:223-32.

147. Rigla M, Sanchez-Quesada JL, Ordonez-Llanos J, Prat T, Caixas A, Jorba O, Serra JR, de Leiva A, Perez A. Effect of physical exercise on lipoprotein(a) and low-density lipoprotein modifications in type 1 and type 2 diabetic patients. *Metabolism*. 2000;49:640-7.
148. Kwiterovich PO Jr. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 1998;82(9A):13Q-21Q.
149. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Kerensky R. Effect of recombinant apoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*. 2003;290:2292-300.
150. Bisgaier CL, Sachdev OP, Megna L, Glickman RM. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. *J Lipid Res*. 1985;26(1):11-25.
151. Shih DM, Gu L, Yia YR, Navab M, Li WF, Hama S, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*. 1998;394(6690):284-7.
152. Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, et al. Human apolipoprotein A-1 enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res*. 2004;95(8):789-97.
153. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*. 2000;101:2510-7.

-
154. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 1998;47(5):598-602.
 155. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschimkus C, Jenkins AJ, Silink M, Donaghue KC. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications*. 2006;20(5):322-8.
 156. Mackness B, Durrington PN, Boulton AJ, Mackness MI. Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98(3):355-63.
 157. Green DJ, Walsh JH, Maiorana AJ, O'Driscoll G. Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: Effects of exercise training. *J Appl Physiol*. 2004;97,749-55.
 158. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke a Krankel N, Shu Y, Baither Y, Geilen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;107:3152-8.
 159. 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;38,860-6.