

**VALERIA AGUIAR GOMES**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO NA FORMAÇÃO DE  
ÓXIDO NÍTRICO EM PACIENTES COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**VALERIA AGUIAR GOMES**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO NA FORMAÇÃO DE  
ÓXIDO NÍTRICO EM PACIENTES COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO TANUS DOS SANTOS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G585e                   Gomes, Valéria Aguiar  
                              Efeitos do exercício aeróbio na formação de óxido nítrico em  
                              pacientes com síndrome metabólica / Valéria Aguiar Gomes.  
                              Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: José Eduardo Tanus dos Santos  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndrome Metabólica. 2. Óxido Nítrico. 3. Nitritos – Efeito  
fisiológico. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Effect of aerobic exercise on nitric oxide availability in patients with  
metabolic syndrome**

**Keywords:** • Metabolic Syndrome  
                  • Nitric Oxide  
                  • Physiologic effect, Nitrites

**Titulação: Mestre em Farmacologia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

**Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior**

**Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack**

**Data da defesa: 19 - 08 - 2008**



---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

**Orientador:**

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

---

**Membros:**

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

Handwritten signature of José Eduardo Tanus dos Santos in black ink.

**Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior**

Handwritten signature of Wilson Nadruz Junior in black ink.

**Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack**

Handwritten signature of Lusiane Maria Bendhack in black ink.

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 19/08/2008**

---

## ***Dedicatória***

*Aos  
meus pais  
por serem meus exemplos,  
minha força,  
meu alicerce e  
aos meus irmãos  
Vanessa e  
Eduardo  
pelas demonstrações de carinho e  
pelo companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

---

À DEUS por iluminar minha vida e ser minha fortaleza.

Ao Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos, não só pelas orientações, mas pela oportunidade oferecida e disponibilidade irrestrita que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Antonio Casella Filho pelas colaborações e sugestões indispensáveis.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia, pelos momentos agradáveis vivenciados durante a realização deste trabalho e principalmente pela amizade, em especial a Vânia por ser uma super amiga em todos os momentos.

Ao professor Doutor Edson Antunes sou imensamente grata pela atenção e auxílio junto a coordenação da Pós-Graduação da Farmacologia – UNICAMP.

À toda minha imensa família pelo apoio, palavras de carinho e por entender a minha ausência em momentos especiais, em especial à minha Mãezinha, meu avó Carlos e minha tia Cleia.

Ao Elísio pelo amor, companheirismo e principalmente pela paciência.

Às minhas amigas-irmãs Danielly e Gizelli pela amizade sólida e verdadeira.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia-UFMA, em especial Alice, Professora Socorro Cartágenes e a Professora Marilene O. R. Borges, pela amizade, carinho e por terem despertado em mim o amor pela Farmacologia.

Aos voluntários que aceitaram participar desse estudo, sem os quais este projeto não existiria.

*“Há duas formas de viver a vida:  
uma é acreditar que não existem milagres e  
a outra é acreditar que todas as coisas são um milagre”.*

*Albert Einstein*

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1- Síndrome Metabólica</b> .....	14
<b>1.2- Exercício Físico</b> .....	16
<b>1.3- Óxido Nítrico</b> .....	17
<b>2- OBJETIVO</b> .....	20
<b>3- CAPÍTULO</b> .....	22
<b>4- DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>5- CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>7- ANEXOS</b> .....	59
Termo de consentimento livre e esclarecido.....	60



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

<b>ADMA-</b>	Dimetilarginina assimétrica
<b>eNOS-</b>	Sintase endotelial do óxido nítrico
<b>FC-</b>	Frequência Cardíaca
<b>GCs-</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>GMPc-</b>	3'5'-monofosfato de guanosina cíclica
<b>HDL-</b>	Lipoproteína de Alta Densidade
<b>HSP-</b>	Proteína de choque térmico
<b>IMC-</b>	Índice de Massa Corpórea
<b>iNOS-</b>	Sintase induzível do óxido nítrico
<b>LDL-</b>	Lipoproteína de Baixa Densidade
<b>MDA-</b>	Malondialdeído
<b>MetS-</b>	Síndrome Metabólica
<b>mmHg-</b>	Milímetro de mercúrio
<b>nNOS-</b>	Sintase neuronal do óxido nítrico
<b>NO-</b>	Óxido Nítrico
<b>PA-</b>	Pressão Arterial
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TBARS-</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

# **RESUMO**

A síndrome metabólica (MetS) consiste em um conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares. O óxido nítrico (NO) exerce papel fundamental na manutenção da homeostase cardiovascular. Portanto, a avaliação da biodisponibilidade do NO é de grande interesse clínico, pois possibilita a avaliação clínica da função vascular. A hipótese deste estudo é que o exercício aeróbio regular aumente a produção de NO em indivíduos com MetS. Para abordar esta questão, foram estudados 48 indivíduos sedentários, dos quais 20 indivíduos eram saudáveis (controles) e 28 pacientes com MetS. Dezoito pacientes com MetS foram submetidos a um período de 3 meses de exercício. Medimos as concentrações de nitrito no sangue total e no plasma, pelo método de quimioluminescência, em todos os participantes e depois do exercício no grupo com MetS. Além disso, avaliamos a concentração plasmática de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), um segundo mensageiro, e dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da óxido nítrico sintase, utilizando ensaios imunoenzimáticos comerciais. Para avaliar o estresse oxidativo, medimos as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) utilizando método fluorimétrico. Os resultados revelaram que o exercício não produziu alterações significativas nas concentrações plasmáticas de nitrito nos pacientes com MetS, mas as concentrações de nitrito no sangue total aumentaram significativamente após o exercício no grupo com MetS. Também neste grupo, observou-se que, a concentração de GMPc aumentou significativamente após o exercício, mas a concentração de ADMA e TBA-RS diminuíram. Nossos resultados sugerem que o exercício aeróbio aumenta a produção de NO em pacientes com MetS proporcionando efeitos benéficos ao sistema cardiovascular.

**Palavras-chave:** Síndrome metabólica, óxido nítrico, nitrito, nitrito no sangue total.

# **ABSTRACT**

The metabolic syndrome (MetS) denotes a clustering of cardiovascular risk factors. The nitric oxide (NO) is plays a pivotal role in the maintenance of cardiovascular homeostasis. The measurement of nitric oxide (NO) bioavailability is of great clinical interest in the assessment of vascular health. We hypothesized that regular aerobic exercise training increase NO production in individuals with MetS. To address this issue, we studied 48 sedentary individuals, 20 healthy subjects (controls) and 28 patients with MetS. Eighteen of those with MetS were subjected to a 3 months of exercise training. We measured by ozone-based chemiluminescence the whole blood and plasma nitrite concentration in all participants, including before and after training in MetS group. In addition, we assessed the plasma concentration of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a second messenger of NO, and asymmetrical dimethylarginine (ADMA), an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, using commercial enzyme immunoassay. To evaluate oxidative stress we measured thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) concentrations using fluorometric method. The results revealed that exercise training produced no significant changes in plasma nitrite concentrations in patients with MetS, but the whole blood nitrite concentrations significantly increased after training in MetS group. Also in this group we observed that, the cGMP concentration significantly increased but the concentration of ADMA, and TBA-RS decreased. Our findings suggest that aerobic exercise increases NO production in patients with metabolic syndrome providing beneficial effects on cardiovascular system.

**Key words:** Metabolic Syndrome, Nitric Oxide, Nitrite, Whole blood nitrite.

# **1- INTRODUÇÃO**

## 1.1- Síndrome Metabólica

O conceito de Síndrome Metabólica (MetS) é conhecido há cerca de 80 anos. É aplicado como um conjunto de fatores de risco cardiometabólicos associados com o aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2. Uma das primeiras observações relacionadas a síndrome foi realizada em 1922 por Kylin onde ele observou uma associação de hipertensão, hiperglicemia e gota (Eckel et al. 2005). Reaven (1998) relacionou esse conjunto de fatores de risco metabólico com a resistência à insulina, originando o termo “síndrome X”. Porém, a MetS também é conhecida como síndrome da resistência à insulina.

Os principais componentes da MetS são hipertensão, resistência à insulina, obesidade e dislipidemia, todos esses componentes estão associados com os fatores de risco para doenças cardiovasculares. De acordo com a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM), a MetS consiste da combinação de pelo menos 3 dos seguintes componentes:

1- Presença de obesidade abdominal estimada pela circunferência abdominal

Homens: circunferência abdominal  $> 102$  cm

Mulheres: circunferência abdominal  $> 88$  cm

2- Concentração plasmática de triglicérides  $\geq 150$  mg/dL ou em uso de medicação hipolipemiante

3- Concentração reduzida de HDL

Homens: HDL  $< 40$  mg/dL

Mulheres: HDL  $< 50$  mg/dL

4- Hipertensão arterial com PA sistólica  $\geq 130$  mmHg e diastólica  $\geq 85$  mmHg ou em uso de medicamento anti-hipertensivo

5- Glicemia de jejum  $\geq 100$  mg/dL ou diagnóstico prévio de diabetes.

Os critérios adotados pela I-DBSM estão de acordo com os critérios estabelecidos pelo National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III-2001) e pela American Heart Association (AHA).

A fisiopatologia da MetS é multifatorial e complexa. A obesidade (representada principalmente pela obesidade abdominal) e a resistência à insulina, que normalmente estão relacionadas, são as duas prováveis causas da síndrome metabólica (Grundy 2006). Sabe-se que a obesidade pode resultar em resistência à insulina, pois em pessoas obesas o tecido adiposo em excesso libera uma variedade de fatores que podem contribuir para a redução da sensibilidade à insulina. Outros fatores que podem contribuir para o desenvolvimento da MetS incluem o tabagismo, sedentarismo, dieta aterogênica, obesidade e fatores genéticos (Grundy et al. 2004b; Eckel et al. 2005).

A MetS é um fator de prognóstico de desenvolvimento de diabetes, pois com a progressão da MetS a diabetes se instala (Hanson et al. 2002; Laaksonen et al. 2002). O risco de um paciente com MetS desenvolver diabetes do tipo 2 é cinco vezes maior do que o paciente sem MetS (Stern et al. 2004), e o risco desse paciente com MetS que desenvolveu diabetes tipo 2 desenvolver alguma doença cardiovascular é de cerca cinco vezes (Stern et al. 2004). A MetS também está associada com o aumento do risco de infarto e acidente vascular encefálico (Ninomiya et al. 2004). Pacientes com MetS tem o dobro de chances de desenvolver doença aterosclerótica quando comparado a pacientes sem MetS (Isomaa et al. 2001; Lakka et al. 2002); (Malik et al. 2004; Ninomiya et al. 2004).

A prevalência de MetS na população americana adulta está em torno de 24% (Ford 2005), e independentemente da definição empregada, a prevalência aumenta com a idade (Isomaa et al. 2001; Grundy et al. 2004a; Eckel et al. 2005; Ford 2005). Devido as diferentes definições de MetS, a comparação da prevalência entre as populações tornou-se difícil. Em alguns estudos que incluíram pessoas entre 20-25 anos a prevalência varia na população urbana entre 8% (Índia) a 24% (EUA) em homens e 7% (França) a 43% (Iran) em mulheres (Eckel et al. 2005).

O National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III-2001), American Heart Association (AHA) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) entre outros estabeleceram definições e critérios de diagnóstico para a MetS, entretanto cada definição



estabelecida apresenta diferentes componentes com isso dificultando o estudo da MetS. Devido as controvérsias sobre a definição ou o significado da síndrome metabólica em 2006 a AHA e a American Diabetes Association (ADA) publicaram uma declaração introduzindo o termo “risco cardiometabólico” para designar o risco de diabetes e doença cardiovascular (Eckel et al. 2006).

## **1.2- Exercício Físico**

A prática de exercícios físicos retarda a progressão da MetS (Grundy et al. 2004b), previne o desenvolvimento de doenças coronarianas (Thompson et al. 2003) e reduz os fatores de risco cardiometabólicos, a morbidade e mortalidade cardiovasculares (Thompson et al. 2003) logo é recomendado como tratamento de pacientes com MetS (Hornig et al. 1996).

O exercício físico regular praticado por longos períodos melhora o perfil lipídico ao reduzir triglicérides plasmáticos (Durstine et al. 2001) e elevar os níveis de HDL (Durstine et al. 2001; Leon and Sanchez 2001). Barnard et al (Barnard et al. 1992) demonstraram que a combinação de atividade física e dieta balanceada em pacientes diabéticos e resistentes à insulina reduz a pressão sangüínea, níveis plasmáticos de glicose, insulina e triglicérides. Em adultos com sobrepeso e obesos tem-se demonstrado que a atividade física é inversamente associada com a prevalência de MetS (Ekelund et al. 2005; LaMonte et al. 2005). Estudo recente avaliou a eficácia do exercício físico em 105 pacientes com MetS e após 20 semanas de exercício físico supervisionado, eles observaram que 30% dos participantes não eram mais classificados como com síndrome metabólica (Katzmarzyk et al. 2003), evidenciando a importância da atividade física regular.

Vários estudos sugerem que a melhora na função cardíaca (Kojda and Hambrecht 2005) dentre outras alterações metabólicas produzidas pela prática do exercício físico pode ser resultado, pelo menos em parte, do aumento na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), pois estudos clínicos evidenciam que o exercício físico regular aumenta os níveis de nitrito e nitrato (NOx), que são os metabólitos do NO (Maeda et al. 2001; Green et al. 2002; Goto et al. 2003; Higashi and Yoshizumi 2004; Maeda et al. 2004; Green et al. 2005; Goto et al. 2007).

Estudos realizados em modelos animais demonstraram que após exercício crônico houve um aumento significativo na expressão do gene da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) que é a enzima que produz NO no endotélio (Sessa et al. 1994). Estudo anterior (Maeda et al. 2001) demonstrou que os níveis de NOx aumentaram significativamente após 8 semanas de exercício e que após 8 semanas de repouso os níveis de NOx retornam aos níveis basais. Portanto, esses trabalhos sugerem que os benefícios no sistema cardiovascular observados em indivíduos que praticam exercício físico regularmente, como por exemplo, os efeitos anti-ateroscleróticos, são promovidos pelo NO já que ocorre um aumento na biodisponibilidade de NOx.

### **1.3- Óxido Nítrico**

O aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) promovido pelo exercício é de fundamental importância, pois a redução da biodisponibilidade do NO é observada em pacientes hipertensos e em outras doenças cardiovasculares, sugerindo que o NO exerce um papel fundamental na fisiopatologia de doenças cardiovasculares ateroscleróticas (Maeda et al. 2001; Maeda et al. 2004).

O NO exerce diversas funções celulares como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, crescimento celular, neurotransmissão, entre outros. O NO é sintetizado a partir da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e NO, sendo a reação catalisada pelo NO-sintase (NOS).

Existem três isoformas desta enzima que estão presentes em vários tecidos. As três isoformas da NOS são: neuronal (nNOS ou NOSI), induzida (iNOS ou NOSII) e endotelial (eNOS ou NOSIII) (Kiechle and Malinski 1993). A eNOS é uma isoforma dependente do complexo cálcio-calmodulina, encontrada nas células endoteliais vasculares e é a principal responsável pela síntese de NO no sistema cardiovascular (Moncada and Higgs 1993; Nathan and Xie 1994; Cooke and Dzau 1997).

O NO interage com o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC), que acarreta uma alteração conformacional desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa sintetiza GMPc a partir da guanosina trifosfato (GTP) (Moncada and Higgs 1993;

Moro et al. 1996; Andreopoulos and Papapetropoulos 2000; Davis et al. 2001a) e um aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula, sendo portanto a via NO-GMPc de fundamental importância para a homeostase vascular.

O NO é um gás cuja meia-vida é de apenas alguns segundos com isso dificultando a sua quantificação. Portanto, a análise da biodisponibilidade do NO produzido pela eNOS é realizada através da dosagem dos principais produtos de oxidação do NO, que são o nitrito e o nitrato (Ellis et al. 1998). No entanto, alguns fatores podem afetar os níveis de nitrato como o sexo, dieta, etnia, medicamentos (Tannenbaum 1979; Kelm 1999) entre outros e com isso limitar o uso desse metabólito para refletir a produção de NO proveniente da atividade da eNOS. Estudos recentes evidenciam que 70% do nitrito circulante advém da atividade basal da eNOS (Kleinbongard et al. 2003). Além disso, as concentrações de nitrito refletem a intensidade de disfunção endotelial em humanos, pois as concentrações de nitrito reduzem com o aumento dos fatores de risco cardiovascular (Kleinbongard et al. 2006). Porém, as medidas de nitrito plasmático ignoram a importância do nitrito e do metabolismo do NO nos eritrócitos, já que estudos sugerem que o eritrócito é um reservatório do nitrito vascular, pois cerca de dois terços do nitrito está localizado no interior das hemácias (Dejam et al. 2005).

Prejuízos na produção ou biodisponibilidade do NO contribuem para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos, como a predisposição à hipertensão, e aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (Moncada et al. 1991; Moncada and Higgs 1993; Cooke and Dzau 1997). A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um dos análogos da L-arginina e inibidor endógeno das três isoformas da NOS, portanto pode contribuir para a redução da produção de NO. A ADMA e os demais análogos da L-arginina não são capazes de servir como substrato da NOS, mas inibe a NOS competitivamente e causam desacoplamento da NOS com os seus co-fatores, com isso a produção de NO fica prejudicada pois a NOS começa a produzir espécies reativas do oxigênio, contribuindo dessa forma para o aumento do estresse oxidativo. A ADMA eleva a pressão sanguínea, causa vasoconstrição e prejudica o relaxamento dependente do endotélio, logo concentrações elevadas de ADMA tem sido associadas com diversas doenças cardiovasculares (Vallance et al. 1992; Boger et al. 1998).

O estresse oxidativo também está associado com diversos eventos patológicos, como hipertensão, diabetes, e aterosclerose. No estresse oxidativo observa-se um aumento das espécies reativas ao oxigênio (ROS) que levam a danos à estruturas de proteínas, lipídios e DNA causando danos celulares como a peroxidação lipídica. Com o aumento da produção de ROS como o ânion superóxido observa-se uma maior interação desse ânion com o NO resultando na formação de peroxinitrito que também é um marcador do estresse oxidativo (Dudzinski et al. 2006) e possui efeito pró-aterogênico e deletério. Portanto, o estresse oxidativo acarreta na inativação do NO e aumento de peroxidação lipídica e dos danos celulares.

Considerando que a prática regular de exercícios físicos leva a uma melhora na função endotelial e que a biodisponibilidade do NO está associada a essa melhora, nenhum trabalho anterior avaliou se a prática de exercícios regulares aumenta a biodisponibilidade de nitrito (principal marcador da produção endógena de NO) em pacientes com síndrome metabólica.

## **2- OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi avaliar se o exercício aeróbico melhora a biodisponibilidade de óxido nítrico em pacientes com Síndrome Metabólica. Para testar esta hipótese, foram avaliados os níveis circulantes de marcadores da formação do NO, como o nitrito plasmático e no sangue total, guanosina 3',5'-monofosfato cíclico. Também, foram medidos os níveis circulantes de dimetilarginina assimétrica (ADMA; um inibidor endógeno da NO sintase) e de espécies reativas do ácido barbitúrico (TBA-RS), para avaliar o estresse oxidativo.

## **3- CAPÍTULO**

**\*Manuscript**

**Aerobic exercise enhances nitric oxide formation in patients with metabolic syndrome**

**Valéria Aguiar Gomes<sup>a</sup>, Antonio Casella-Filho<sup>b</sup>, Antonio C.Palandri Chagas<sup>b</sup>,  
Jose E. Tanus-Santos<sup>c\*</sup>**

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup>Atherosclerosis Unit, Heart Institute (Incor), Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

\*Corresponding author: Jose Eduardo Tanus-Santos, MD, PhD.

Department of Pharmacology

Faculty of Medicine of Ribeirao Preto

University of Sao Paulo

Av. Bandeirantes, 3900

14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil

FAX: +55 16 3633 2301

Phone: +55 16 3602 3163

e-mail: [tanus@fmrp.usp.br](mailto:tanus@fmrp.usp.br)



**Running title:** Metabolic syndrome and nitric oxide

**Acknowledgements:** This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil).

**Abstract:** The metabolic syndrome (MetS) denotes a clustering of cardiovascular risk factors. The measurement of nitric oxide (NO) bioavailability is of great clinical interest in the assessment of vascular health. We hypothesized that regular aerobic exercise training increase NO production in individuals with MetS. To address this issue, we studied 48 sedentary individuals, 20 healthy subjects (controls) and 28 patients with MetS. Eighteen of those with MetS were subjected to a 3 months of exercise training. We measured by ozone-based chemiluminescence the whole blood and plasma nitrite concentration in all participants, including before and after training in MetS group. In addition, we assessed the plasma concentration of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), a second messenger of NO, and ADMA, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, using commercial enzyme immunoassay. To evaluate oxidative stress we measured thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) concentrations using fluorometric method. The results revealed that exercise training produced no significant changes in plasma nitrite concentrations in patients with MetS, but the whole blood nitrite concentrations significantly increased after training in MetS group. Also in this group we observed that, the cGMP concentration significantly increased but the concentration of ADMA, and TBA-RS decreased. Our findings suggest that aerobic exercise increases NO production in patients with metabolic syndrome providing beneficial effects on cardiovascular system.

**Key words:** Metabolic Syndrome, Nitric Oxide, Nitrite, Whole blood nitrite.

## Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is defined as a clustering of risk factors associated with an increased risk for diabetes and cardiovascular disease [1]. The key components of MetS include hypertension, insulin resistance, dyslipidemia, and abdominal obesity, all associated as risk factors for cardiovascular disease [1]. Regardless of how MetS is defined, its prevalence is highly age-dependent [2, 3], and smoking, atherogenic diet, obesity, genetic factors, and physical inactivity contribute for its increasing prevalence [2, 4].

The management of patients with MetS includes the recommendation for regular physical activity [4]. This recommendation is based on the fact that physical activity improves metabolic risk factors and delays the development of coronary artery disease [5], thus reducing cardiovascular morbidity and mortality [6]. Indeed, physical activity is inversely associated with the prevalence of MetS, even among overweight and obese individuals [7, 8]. In addition to beneficial metabolic modifications [9], exercise training produces a variety of cardiovascular beneficial effects including reductions in blood pressure and improved vascular function [10-14], which may result, at least in part, from increased nitric oxide (NO) bioactivity [15, 16]. This probably is of major importance because NO plays a pivotal role in the maintenance of cardiovascular homeostasis [17, 18], and impaired NO bioavailability has been reported in hypertension and other cardiovascular diseases [19-22]. Therefore, enhanced NO formation associated with exercise training could improve vascular function, attenuate leukocyte adhesion to endothelial cells, inhibit platelet aggregation, and modulate smooth muscle proliferation [19] in patients with MetS.

The aim of the present study was to examine whether aerobic exercise training improves NO bioavailability in patients with MetS. To test this hypothesis, we assessed the circulating levels of markers of NO formation [23-27] such as plasma and whole blood nitrite, and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP). In addition, we also measured the circulating levels of asymmetrical dimethylarginine (ADMA; an endogenous inhibitor of NO synthase [28]) and thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS; to assess oxidative stress [29]).

## **Materials and Methods**

### **Subjects and study protocol**

The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the University of Sao Paulo Medical School, and each subject provided written informed consent. Forty-eight subjects were studied, including 28 patients with MetS selected from the routine outpatient clinic of the Heart Institute, and 20 healthy controls randomly selected from the local population and unrelated to the patients. All participants underwent a complete medical history and physical examination prior and after to the exercise intervention. The subjects were non smokers and abstainers or only moderate alcohol consumers (less than <25 g/d). Participants with evidence of cardiovascular, renal, hepatic, gastrointestinal, pulmonary, endocrine or oncological diseases were excluded. None was receiving antioxidant vitamin supplementation or drugs known to affect lipoprotein metabolism. Metabolic syndrome was defined according to the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement [30].

### **Cardiopulmonary exercise test and determination of exercise intensity training**

Eighteen patients in the MetS group were subjected to an individual exercise (E+) training for 3 months and ten other patients with MetS remained as a sedentary group (E-). Prior to starting the exercise training, the participants underwent a cardiopulmonary exercise test to measure maximum oxygen consumption ( $VO_2$  max), thus allowing the determination of appropriate individual level of exercise intensity. This level of exercise was set with basis on the heart rate corresponding to the anaerobic threshold up to 10% below the respiratory compensation point. The anaerobic threshold was considered to occur when the linearity between oxygen uptake and carbon dioxide production was lost. The exercise training consisted of a three times a week supervised and controlled training load (45 min/day) for 3 months on a bicycle ergometer at the training heart rate.

Blood samples for assessment of markers of NO formation, ADMA, TBA-RS, and other laboratory tests were collected from healthy controls, and from patients with MetS before (baseline; BL) and after three months of exercise (E+) or lack of exercise (E-).

## **Laboratory tests**

Blood samples for serum lipid profile and glycemia determinations were obtained after at least 12 hours of fasting and always at the same period of the menstrual cycle in women, and at least 16 hours after the last exercise session. Total plasma cholesterol, triglycerides, glycemia and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured by commercially available kits using standardized techniques. The low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated as described by Friedewald et al [31].

### **Measurement of plasma nitrite concentrations**

Venous blood samples were collected in tubes containing heparin and immediately centrifuged at 1,000 g for 3 min. Plasma aliquots were stored at -70 °C until analyzed in triplicate for their nitrite content using an ozone-based chemiluminescence assay as previously described [32-35]. Briefly, to measure nitrite concentrations in plasma, 300 µL of plasma samples were injected into a solution of acidified tri-iodide, purging with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (Sievers Model 280 NO Analyzer, Boulder, CO, USA). Approximately 8 mL of tri-iodide solution (2 g potassium iodide and 1.3 g iodine dissolved in 40 mL water with 140 mL acetic acid) were placed in the purge vessel into which plasma samples were injected. The tri-iodide solution reduces nitrites to NO gas, which is detected by the NO analyzer.

### **Measurement of whole blood nitrite concentrations**

Venous blood samples were collected in tubes containing heparin and immediately mixed with a nitrite preservation solution in a 4:1 dilution, as previously described [29, 36, 37]. Briefly, this solution contains 0.8 M ferricyanide and 1% NP-40 [29, 36, 37]. The samples were deproteinated with methanol (1:1) and centrifuged at 14,000g for 3 min. Then, 300 µL supernatant were injected into the solution of acidified tri-iodide,

purged with nitrogen in-line with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer, as described above.

### **Measurement of plasma cGMP and ADMA concentrations**

Venous blood samples were collected in tubes containing EDTA for the determination of plasma cGMP (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and ADMA (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Germany) levels using commercial enzyme immunoassays (ELISA). The plasma was separated by centrifugation and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until assayed according to the manufacturer's instructions.

### **Measurement of Thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) in plasma**

Plasma lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid reactive substances using a fluorometric method as previously described [38]. This method requires excitation at 515 nm and emission at 553 nm and uses 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard. The lipoperoxide levels were expressed in terms of malondialdehyde (nmol/ml).

### **Statistical analysis**

All the results were expressed as mean  $\pm$  SEM. The clinical characteristics of study groups were compared by Student unpaired  $t$  test. Within and between groups comparisons were assessed by Student unpaired  $t$  test and Student paired  $t$  test. A probability value  $< 0.05$  was considered the minimum level of statistical significance.

## Results

The clinical characteristics of all participants are summarized in the Table 1. We found no significant differences in age, LDL-cholesterol, and total cholesterol when Controls were compared with patients with MetS (all  $P < 0.05$ ; Table 1). However, patients with MetS presented higher BMI, waist circumference, arterial blood pressure, triglycerides, LDL, and glycemia compared with Controls (all  $P < 0.05$ ; Table 1). Moreover, patients with MetS presented lower HDL levels than Controls ( $P < 0.05$ ; Table 1). Exercise training produced no significant changes in these clinical and biochemical parameters (all  $P > 0.05$ ; Table 1).

Interestingly, patients with MetS had significant lower plasma and whole blood nitrite concentrations compared with those found in Controls (both  $P < 0.05$ ; Figs. 1A and 1B). While exercise training produced no significant changes in plasma nitrite levels ( $P > 0.05$ ; Fig. 1A), the circulating concentrations of nitrite in whole blood increased significantly in patients with MetS (from  $242 \pm 33$  nM to  $465 \pm 64$  nM;  $P < 0.05$ ; Fig. 1B).

Patients with MetS had significant lower plasma cGMP concentrations compared with those found in Controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 2), and exercise training increased plasma cGMP concentrations in patients with MetS (from  $10.4 \pm 1.6$  fmol/ $\mu$ L to  $13.8 \pm 1.8$  fmol/ $\mu$ L;  $P < 0.05$ ; Fig. 2).

Although we found no significant differences in the circulating ADMA concentrations when patients with MetS were compared with Controls ( $P > 0.05$ ; Fig. 3), these levels decreased significantly after exercise training in patients with MetS (from  $1.96 \pm 0.11$   $\mu$ mol/L to  $1.73 \pm 0.09$   $\mu$ mol/L;  $P < 0.05$ ; Fig. 3).

We found increased TBA-RS concentrations in patients with MetS compared with Controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 4), and exercise training reduced significantly these concentrations (from  $8.08 \pm 0.52$  nmol/mL to  $6.60 \pm 0.33$  nmol/mL;  $P < 0.05$ ; Fig. 4).

## Discussion

The main findings of the present study were: i) compared with healthy subjects, patients with MetS have lower concentrations of markers of NO formation, including whole blood nitrite, plasma nitrite, and plasma cGMP, which were associated with increased oxidative stress; ii) exercise training increases the concentrations of some markers of NO formation (whole blood nitrite and cGMP) and decreases oxidative stress, and the circulating concentrations of an endogenous inhibitor of NO synthase (ADMA). To our knowledge, this is the first study showing clinical evidence for lower endogenous NO formation in patients with MetS, and for improvements in NO formation associated with exercise training in MetS patients.

The increased cardiovascular risk associated with MetS [1], a condition affecting about 25% of US adults [2], is inversely associated with physical activity [7]. Therefore starting on regular physical activity may reduce the cardiovascular risk of MetS patients, even though the mechanisms for this beneficial effect are not entirely known. We found lowered plasma nitrite levels in MetS patients compared with healthy controls, and these results may reflect the degree of endothelial dysfunction commonly seen in MetS patients [23]. Moreover, we found that exercise training increased whole blood nitrite concentrations in MetS patients, and the circulating levels of nitrite (a major vascular storage pool of NO [39]) reflect NO synthase activity [23, 24, 26, 40]. Supporting these findings, whole blood nitrite concentrations were suggested to better reflect NO production because erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in the blood [37]. These findings are consistent with the suggestion that exercise training could improve endothelial dysfunction in MetS patients by enhancing NO bioavailability [10-13], thus reducing their cardiovascular risk.

NO stimulates soluble guanylyl cyclase to increase cGMP content [41]. This molecule is a major mediator of many of the biological effects of NO [41], and the circulating concentrations of cGMP may reflect NO synthase activity [27, 42]. Interestingly, our cGMP results paralleled our whole blood nitrite results, thus further supporting the ideas that patients with MetS have lower NO activity, and that exercise training improves NO formation in these patients. The increases in cGMP that we found in

MetS patients after exercise training are similar to those found in subjects with elevated cardiovascular risk after a 12-week endurance training [43], and to those found in elderly women after 3 months of moderate aerobic exercise [13].

The precise mechanisms by which exercise training improves NO formation are still not well elucidated. Increased vascular shear stress is certainly a major factor. Indeed, exercise increases blood flow and vascular shear stress, thus stimulating NO formation and up-regulating eNOS protein levels through multiple mechanisms [12, 37, 44, 45]. Our findings, however, may offer some mechanistic clues about this issue. ADMA is an endogenous inhibitor of NO synthase [28], and mounting evidence indicates that elevated ADMA concentrations are associated with increased cardiovascular risk [28, 46, 47]. Although we found similar circulating ADMA levels in MetS patients and healthy controls, these levels decreased significantly after exercise training, thus suggesting the increases in NO formation that we found after exercise training could be due, at least in part, to the reductions in ADMA concentrations. This suggestion is supported by similar decreases in ADMA concentrations after exercise training that has been reported in patients with type 1 diabetes mellitus [48].

Another mechanism that may be involved in the increased NO bioavailability after exercise training is decreased oxidative stress [49]. In fact, increased production of reactive oxygen species (ROS) has been proposed as a contributing factor to MetS [50], and ROS may inactivate NO [49]. Therefore, it is possible that the increases in whole blood nitrite found in the present study may have resulted, at least in part, from the decreases in oxidative stress, as suggested by lower TBA-RS concentrations after exercise training. These results are supported by previous results showing that aerobic exercise training reduces oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus [51]. However, additional studies are necessary to elucidate the mechanisms lead to improve of NO production after exercise.

In conclusion, our data show impaired NO activity and increased oxidative stress in patients with MetS, which are partially reverted by exercise training. These biochemical effects caused by exercise training were associated with decreases in the circulating levels of an endogenous inhibitor of NO synthesis, and may explain part of the beneficial cardiovascular effects commonly found after exercise training.



## References

- [1] Grundy, S. M.; Brewer, H. B., Jr.; Cleeman, J. I.; Smith, S. C., Jr.; Lenfant, C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:e13-18; 2004.
- [2] Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* 365:1415-1428; 2005.
- [3] Ford, E. S. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 28:2745-2749; 2005.
- [4] Grundy, S. M.; Hansen, B.; Smith, S. C., Jr.; Cleeman, J. I.; Kahn, R. A. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 109:551-556; 2004.
- [5] Thompson, P. D.; Buchner, D.; Pina, I. L.; Balady, G. J.; Williams, M. A.; Marcus, B. H.; Berra, K.; Blair, S. N.; Costa, F.; Franklin, B.; Fletcher, G. F.; Gordon, N. F.; Pate, R. R.; Rodriguez, B. L.; Yancey, A. K.; Wenger, N. K. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107:3109-3116; 2003.
- [6] Hornig, B.; Maier, V.; Drexler, H. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 93:210-214; 1996.
- [7] Ekelund, U.; Brage, S.; Franks, P. W.; Hennings, S.; Emms, S.; Wareham, N. J. Physical activity energy expenditure predicts progression toward the metabolic syndrome independently of aerobic fitness in middle-aged healthy Caucasians: the Medical Research Council Ely Study. *Diabetes Care* 28:1195-1200; 2005.

- [8] LaMonte, M. J.; Barlow, C. E.; Jurca, R.; Kampert, J. B.; Church, T. S.; Blair, S. N. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation* 112:505-512; 2005.
- [9] Kojda, G.; Hambrecht, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67:187-197; 2005.
- [10] Goto, C.; Higashi, Y.; Kimura, M.; Noma, K.; Hara, K.; Nakagawa, K.; Kawamura, M.; Chayama, K.; Yoshizumi, M.; Nara, I. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 108:530-535; 2003.
- [11] Green, D. J.; Maiorana, A.; O'Driscoll, G.; Taylor, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561:1-25; 2004.
- [12] Maeda, S.; Miyauchi, T.; Kakiyama, T.; Sugawara, J.; Iemitsu, M.; Irukayama-Tomobe, Y.; Murakami, H.; Kumagai, Y.; Kuno, S.; Matsuda, M. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci* 69:1005-1016; 2001.
- [13] Maeda, S.; Tanabe, T.; Otsuki, T.; Sugawara, J.; Iemitsu, M.; Miyauchi, T.; Kuno, S.; Ajisaka, R.; Matsuda, M. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res* 27:947-953; 2004.
- [14] Taddei, S.; Galetta, F.; Viridis, A.; Ghiadoni, L.; Salvetti, G.; Franzoni, F.; Giusti, C.; Salvetti, A. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation* 101:2896-2901; 2000.
- [15] Green, D.; Cheetham, C.; Mavaddat, L.; Watts, K.; Best, M.; Taylor, R.; O'Driscoll, G. Effect of lower limb exercise on forearm vascular function: contribution of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H899-907; 2002.
- [16] Green, D. J.; Bilsborough, W.; Naylor, L. H.; Reed, C.; Wright, J.; O'Driscoll, G.; Walsh, J. H. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol* 562:617-628; 2005.

- [17] Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9269; 1987.
- [18] Palmer, R. M.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526; 1987.
- [19] Cooke, J. P.; Dzau, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48:489-509; 1997.
- [20] Thomas, G. D.; Zhang, W.; Victor, R. G. Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. *Jama* 285:2055-2057.; 2001.
- [21] Sandrim, V. C.; de Syllos, R. W.; Lisboa, H. R.; Tres, G. S.; Tanus-Santos, J. E. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes affect the susceptibility to hypertension in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 189:241-246; 2006.
- [22] Sandrim, V. C.; de Syllos, R. W.; Lisboa, H. R.; Tres, G. S.; Tanus-Santos, J. E. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide* 16:348-355; 2007.
- [23] Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Lauer, T.; Jax, T.; Kerber, S.; Gharini, P.; Balzer, J.; Zotz, R. B.; Scharf, R. E.; Willers, R.; Schechter, A. N.; Feelisch, M.; Kelm, M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 40:295-302; 2006.
- [24] Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Lauer, T.; Rassaf, T.; Schindler, A.; Picker, O.; Scheeren, T.; Godecke, A.; Schrader, J.; Schulz, R.; Heusch, G.; Schaub, G. A.; Bryan, N. S.; Feelisch, M.; Kelm, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35:790-796; 2003.
- [25] Lauer, T.; Kleinbongard, P.; Kelm, M. Indexes of NO bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 17:251-255; 2002.

- [26] Lauer, T.; Preik, M.; Rassaf, T.; Strauer, B. E.; Deussen, A.; Feelisch, M.; Kelm, M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12814-12819; 2001.
- [27] Metzger, I. F.; Sertorio, J. T. C.; Tanus-Santos, J. E. Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. *Acta Physiol* 188:123-127. ; 2006.
- [28] Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J.; Moncada, S. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 12:S60-62; 1992.
- [29] Nagasaki, S.; Sertorio, J. T. C.; Metzger, I. F.; Bem, A. F.; Rocha, J. B. T.; Tanus-Santos, J. E. eNOS gene T-786C polymorphism modulates atorvastatin-induced increase in blood nitrite. *Free Radic Biol Med* 41 1044-1049 2006.
- [30] Grundy, S. M.; Cleeman, J. I.; Daniels, S. R.; Donato, K. A.; Eckel, R. H.; Franklin, B. A.; Gordon, D. J.; Krauss, R. M.; Savage, P. J.; Smith, S. C., Jr.; Spertus, J. A.; Costa, F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735-2752; 2005.
- [31] Friedewald, W. T.; Levy, R. I.; Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502; 1972.
- [32] Metzger, I. F.; Souza-Costa, D. C.; Marroni, A. S.; Nagasaki, S.; Desta, Z.; Flockhart, D. A.; Tanus-Santos, J. E. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet Genomics* 15:565-570; 2005.
- [33] Nagasaki, S.; Metzger, I. F.; Souza-Costa, D. C.; Marroni, A. S.; Uzuelli, J. A.; Tanus-Santos, J. E. eNOS genotype is without effect on circulating nitrite/nitrate level in healthy male population. *Thromb Res* 115:375-379; 2005.

- [34] Yang, B. K.; Vivas, E. X.; Reiter, C. D.; Gladwin, M. T. Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. *Free Radic Res* 37:1-10; 2003.
- [35] Dias-Junior, C. A.; Gladwin, M. T.; Tanus-Santos, J. E. Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Free Radic Biol Med* 41:1764-1770; 2006.
- [36] Pelletier, M. M.; Kleinbongard, P.; Ringwood, L.; Hito, R.; Hunter, C. J.; Schechter, A. N.; Gladwin, M. T.; Dejam, A. The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free Radic Biol Med* 41:541-548; 2006.
- [37] Dejam, A.; Hunter, C. J.; Pelletier, M. M.; Hsu, L. L.; Machado, R. F.; Shiva, S.; Power, G. G.; Kelm, M.; Gladwin, M. T.; Schechter, A. N. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 106:734-739; 2005.
- [38] Cau, S. B.; Dias-Junior, C. A.; Montenegro, M. F.; de Nucci, G.; Antunes, E.; Tanus-Santos, J. E. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* 581:132-137; 2008.
- [39] Cosby, K.; Partovi, K. S.; Crawford, J. H.; Patel, R. P.; Reiter, C. D.; Martyr, S.; Yang, B. K.; Waclawiw, M. A.; Zalos, G.; Xu, X.; Huang, K. T.; Shields, H.; Kim-Shapiro, D. B.; Schechter, A. N.; Cannon, R. O., 3rd; Gladwin, M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9:1498-1505; 2003.
- [40] Kelm, M.; Preik-Steinhoff, H.; Preik, M.; Strauer, B. E. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 41:765-772; 1999.
- [41] Waldman, S. A.; Murad, F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev.* 39:163-196.; 1987.
- [42] Kielstein, J. T.; Impraim, B.; Simmel, S.; Bode-Boger, S. M.; Tsikas, D.; Frolich, J. C.; Hoepfer, M. M.; Haller, H.; Fliser, D. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 109:172-177; 2004.

[43] Richter, B.; Niessner, A.; Penka, M.; Grdic, M.; Steiner, S.; Strasser, B.; Ziegler, S.; Zorn, G.; Maurer, G.; Simeon-Rudolf, V.; Wojta, J.; Huber, K. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost* 94:1306-1311; 2005.

[44] Davis, M. E.; Cai, H.; Drummond, G. R.; Harrison, D. G. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89:1073-1080; 2001.

[45] Traub, O.; Berk, B. C.; Davis, M. E.; Cai, H.; Drummond, G. R.; Harrison, D. G. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force

Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:677-685; 1998.

[46] Boger, R. H.; Bode-Boger, S. M.; Szuba, A.; Tsao, P. S.; Chan, J. R.; Tangphao, O.; Blaschke, T. F.; Cooke, J. P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:1842-1847; 1998.

[47] Valkonen, V. P.; Paiva, H.; Salonen, J. T.; Lakka, T. A.; Lehtimaki, T.; Laakso, J.; Laaksonen, R.; Boger, R. H.; Bode-Boger, S. M.; Szuba, A.; Tsao, P. S.; Chan, J. R.; Tangphao, O.; Blaschke, T. F.; Cooke, J. P. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Lancet* 358:2127-2128; 2001.

[48] Mittermayer, F.; Pleiner, J.; Krzyzanowska, K.; Wiesinger, G. F.; Francesconi, M.; Wolzt, M. Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 117:816-820; 2005.

- [49] Higashi, Y.; Yoshizumi, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* 102:87-96; 2004.
- [50] Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y.; Nakayama, O.; Makishima, M.; Matsuda, M.; Shimomura, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114:1752-1761; 2004.
- [51] Nojima, H.; Watanabe, H.; Yamane, K.; Kitahara, Y.; Sekikawa, K.; Yamamoto, H.; Yokoyama, A.; Inamizu, T.; Asahara, T.; Kohno, N. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 57:170-176; 2008.
- [52] Hogg, N.; Kalyanaraman, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1411:378-384; 1999.

**Table 1-** Clinical and laboratorial characteristics of study groups.

	<b>Controls</b>	<b>Metabolic Syndrome</b>			
<b>Age (years)</b>	49.4 ± 2.3	45.5 ± 2.4			
		<b>BL</b>	<b>E-</b>	<b>BL</b>	<b>E+</b>
<b>N</b>	20	10	10	18	18
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.3 ± 1	33.2 ± 1	33.4 ± 1	33.6 ± 1*	33.5 ± 1
<b>WC (cm)</b>	88 ± 2	103 ± 2*	104 ± 2	111 ± 2*	107 ± 2
<b>SAP (mmHg)</b>	119 ± 2	140 ± 3*	139 ± 2	140 ± 2*	136 ± 2
<b>DAP (mmHg)</b>	74 ± 2	90 ± 2*	88 ± 2	92 ± 1*	89 ± 1
<b>HR (bpm)</b>	70 ± 2	76 ± 2	75 ± 1	75 ± 1*	72 ± 1
<b>TChol (mg/dL)</b>	191 ± 6	201 ± 7	204 ± 6	202 ± 5	195 ± 6
<b>Trigl (mg/dL)</b>	121 ± 7	212 ± 18*	195 ± 15	214 ± 16*	181 ± 16
<b>HDL (mg/dL)</b>	51 ± 2	39 ± 1*	40 ± 1	36 ± 1*	37 ± 1
<b>LDL (mg/dL)</b>	115 ± 6	119 ± 6	124 ± 3	127 ± 6	122 ± 7
<b>Glycemia (mg/dL)</b>	80 ± 1	102 ± 4*	108 ± 5	113 ± 5*	102 ± 4

Values are the mean ± S.E.M.; BMI = body mass index; WC= waist circumference; SAP = systolic arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure; HR = heart rate; TChol = total cholesterol; Trigl = Triglycerides.

\* = P<0.05 *versus* Healthy controls.



## Figure Legends:

**Figure 1-** Plasma nitrite (panel A) and whole blood nitrite (panel B) concentrations in Controls (N = 20; open bars), and in patients with metabolic syndrome, before and after 3 months without exercise training (E-; N=10; diagonal bars), and before and after 3 months of exercise training (E+; N = 18; solid bars).

The bars indicate the means  $\pm$  S.E.M.

\* P<0.05 vs. Controls, by unpaired t test.

# P<0.05 vs. respective Baseline (BL), by paired t test.

**Figure 2-** Plasma cGMP concentrations in Controls (N = 20; open bars), and in patients with metabolic syndrome, before and after 3 months without exercise training (E-; N=10; diagonal bars), and before and after 3 months of exercise training (E+; N = 18; solid bars).

The bars indicate the means  $\pm$  S.E.M.

\* P<0.05 vs. Controls, by unpaired t test.

# P<0.05 vs. respective Baseline (BL), by paired t test.

**Figure 3-** Plasma ADMA concentrations in Controls (N = 20; open bars), and in patients with metabolic syndrome, before and after 3 months without exercise training (E-; N=10; diagonal bars), and before and after 3 months of exercise training (E+; N = 18; solid bars).

The bars indicate the means  $\pm$  S.E.M.

\* P<0.05 vs. Controls, by unpaired t test.

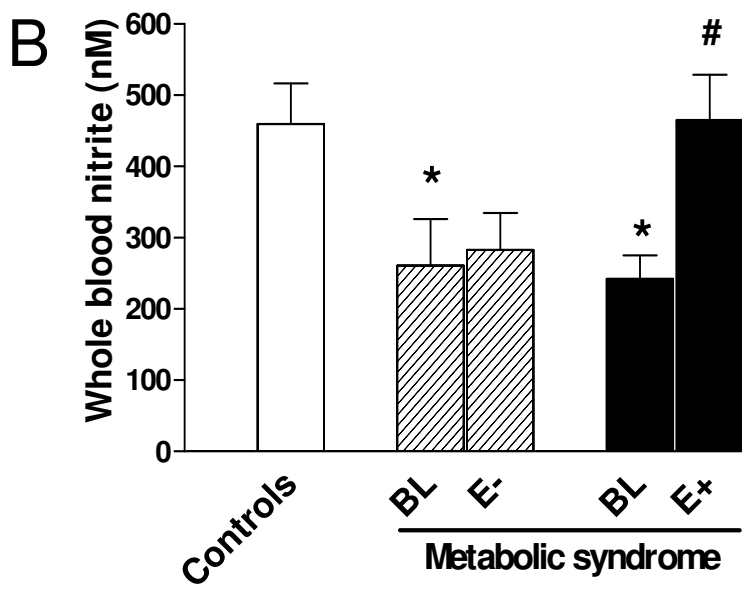
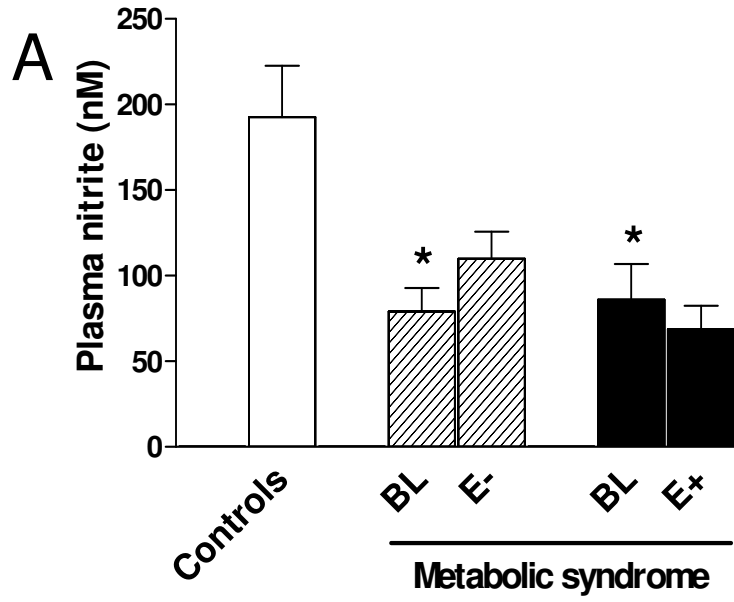
# P<0.05 vs. respective Baseline (BL), by paired t test.

**Figure 4-** Thiobarbituric acid reactive substances expressed in terms of malondialdehyde (MDA) in plasma samples from Controls (N = 20; open bars), and from patients with metabolic syndrome, before and after 3 months without exercise training (E-; N=10; diagonal bars), and before and after 3 months of exercise training (E+; N = 18; solid bars).

The bars indicate the means  $\pm$  S.E.M.

\* P<0.05 vs. Controls, by unpaired t test.

# P<0.05 vs. respective Baseline (BL), by paired t test.



**Figure 1**

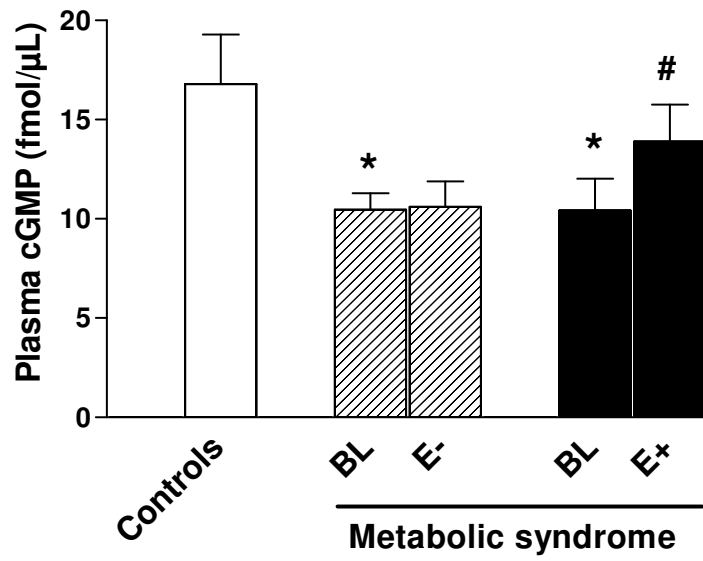


Figure 2

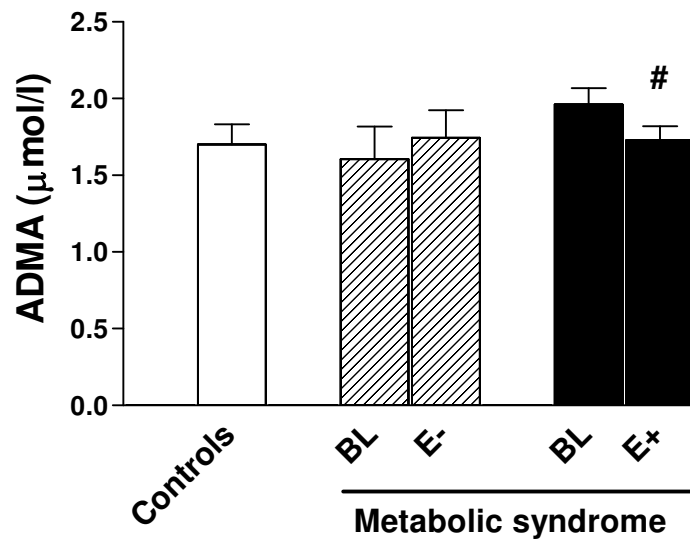


Figure 3

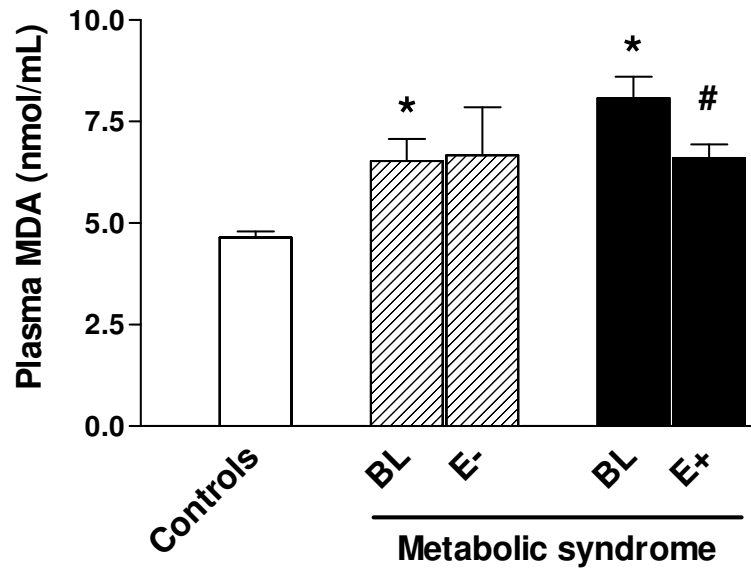


Figure 4

## **4- DISCUSSÃO**

Neste estudo, foi investigado principalmente o impacto do exercício físico nas concentrações de nitrito em pacientes com síndrome metabólica. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo do nitrito no sangue total e nas concentrações plasmáticas GMPC. Correspondentemente, o exercício reduziu as concentrações plasmáticas de ADMA e MDA. Estes resultados sugerem que o exercício aumenta a produção de NO e este aumento pode ter efeitos benéficos sobre a redução dos fatores de risco associados com MetS e, conseqüentemente, melhorar a fisiologia cardiovascular.

Cerca de 24% dos adultos americanos têm MetS e esta prevalência aumenta com a obesidade e com a idade (Eckel et al. 2005). Estudos anteriores demonstraram uma associação inversa entre atividade física e síndrome metabólica (Ekelund et al. 2005), sugerindo que o exercício possa contribuir para a prevenção e redução do impacto dos fatores de risco na MetS. De acordo com pesquisas anteriores, o exercício pode melhorar a função endotelial, essa alteração está relacionada com o aumento na biodisponibilidade do NO (Maeda et al. 2001; Goto et al. 2003; Maeda et al. 2004). O nitrito e nitrato são produtos da oxidação do NO e são utilizados para a análise da biodisponibilidade do NO (Kleinbongard et al. 2003), pois o NO tem rápida distribuição e meia-vida curta com isso dificultando a sua quantificação. Pesquisas sugerem que as concentrações de nitrito refletem de forma mais sensível a produção de NO pela eNOS (Kelm et al. 1999; Lauer et al. 2001; Kleinbongard et al. 2003; Kleinbongard et al. 2006) do que as concentrações de nitrato. Pois, as concentrações de nitrato podem ser influenciadas por uma variedade de fatores independentes da NOS, incluindo dieta, síntese de nitrato por bactérias intestinais, função renal entre outros (Tannenbaum 1979; Kelm 1999).

A eNOS é a principal isoforma da NOS nos vasos. Estudos em animais nocaute do gene da eNOS (--/--) demonstraram concentração de nitrito plasmático reduzida em cerca de 70%, redução semelhante foi observada em animais selvagens (+/+) que tiveram a eNOS inibida pelo N(G)-nitro-L-arginina metilester (L-NAME), portanto dois terços do nitrito plasmático advém da atividade basal da eNOS. Pesquisas sugerem que as concentrações de nitrito refletem de forma mais sensível a produção de NO pela eNOS (Kelm et al. 1999; Lauer et al. 2001; Kleinbongard et al. 2003; Kleinbongard et al. 2006) pois pode refletir mudanças agudas da atividade da eNOS (Lauer et al. 2001). O nitrito

também foi relacionado como melhor marcador para mudanças crônicas da atividade da eNOS, como por exemplo na disfunção endotelial, pois observa-se redução dos níveis de nitrito com o aumento de fatores de risco para doença cardiovascular (Kleinbongard et al. 2006).

Nossos resultados revelaram que o exercício aumentou as concentrações de nitrito no sangue total, mas não alterou significativamente as concentrações plasmáticas de nitrito. Entretanto, um estudo recente demonstrou que as concentrações de nitrito no sangue total refletem melhor a produção de NO produzido pela eNOS do que as concentrações plasmáticas de nitrito (Dejam et al. 2005). Isto se deve principalmente ao fato de que quando medimos as concentrações de nitrito no plasma ignoramos as altas concentrações de nitrito eritrocitário e cerca de dois terços do nitrito está presente no eritrócito.

A meia-vida curta do nitrito no sangue também é um obstáculo técnico na dosagem do nitrito plasmático, pois exige uma separação rápida do plasma. Para corrigir esse problema utilizamos uma solução que estabiliza o nitrito no sangue total, pois esta solução contém ferrocianeto que reage com a hemoglobina para formar metahemoglobina. A reação da hemoglobina com o nitrito representa o maior mecanismo de degradação do nitrito, e ao adicionarmos ferrocianeto estabilizamos o nitrito no sangue total (Dejam et al. 2005). Recentemente, demonstraram que o nitrito do sangue total reflete o aumento da atividade da NOS ao ser estimulada por infusão de acetilcolina e *shear stress* in vivo, usando a solução com ferricianeto (Dejam et al. 2005). Portanto, a análise do nitrito no sangue total é uma quantificação sensível da produção de NO pela eNOS.

Os mecanismos pelos quais o exercício melhora a biodisponibilidade de NO ainda não estão bem elucidados. Um dos prováveis mecanismos é que o aumento do fluxo sanguíneo promovido pelo exercício promove um aumento da força de cisalhamento vascular (*shear stress*). Sabe-se que o *shear stress* estimula a liberação de substâncias vasoativas, mudanças na expressão de alguns genes, metabolismo celular e na morfologia celular (Davies 1995; Traub and Berk 1998). O *shear stress* é um dos mais poderosos estímulos fisiológicos da liberação de NO, acredita-se que os efeitos benéficos promovidos pelo exercício sejam devido, pelo menos em parte, ao *shear stress* que induz ao aumento da liberação de NO (Traub et al. 1998). Já foi demonstrado que a tensão de cisalhamento pode

ativar várias vias de sinais de transdução através de mecanosensores, como c-src, caveola, proteínas G, PI-3 quinase, proteína de choque térmico (HSP), que conduzirão a um aumento na atividade da eNOS durante o exercício (Traub and Berk 1998; Davis et al. 2001b). No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos que levam a uma melhora na produção de NO após o exercício. Nossos resultados demonstraram também um aumento dos níveis de GMPc em pacientes com MetS após o exercício, o que confirma a melhora da biodisponibilidade do NO, pois o NO induz a estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumenta os níveis de GMPc que é o principal mediador dos efeitos biológicos de NO. Entretanto, as concentrações de GMPc circulantes também podem refletir a liberação de mediadores que não sejam o NO, tais como peptídeo natriurético e de monóxido de carbono (Hirata et al. 1987; Kim et al. 2006). Porém, recentemente Metzger et al (Metzger et al. 2006) mostrou uma correlação significativa entre as concentrações plasmáticas de nitrito e de GMPc. EM um estudo realizado com mulheres idosas os níveis plasmáticos de GMPc aumentaram significativamente depois de 3 meses de exercício (Maeda et al. 2004), confirmando nossos achados. Richter et al (Richter et al. 2005) relacionou o aumento na regulação dos níveis plasmáticos de GMPc com a redução nos níveis séricos de ADMA, um inibidor endógeno da NO sintase (Vallance et al. 1992) em dez pacientes com doença arterial coronária.

Outro resultado importante nesse estudo foram os níveis de ADMA reduzidos nos pacientes com MetS após o exercício. Tem-se evidenciado que concentrações elevadas de ADMA estão associadas ao aumento do fator de risco cardiovascular (Vallance et al. 1992; Boger et al. 1998; Valkonen et al. 2001). A inibição da produção de NO pela ADMA (Vallance et al. 1992) pode levar a disfunção endotelial em humanos. Dados semelhantes aos encontrados nesse estudo foram demonstrados recentemente em estudo realizado em pacientes com diabetes mellitus tipo 1, onde as concentrações de ADMA diminuíram após o exercício (Mittermayer et al. 2005). Assim, a redução na concentração de ADMA que nos encontramos pode ter influenciado no aumento da concentração de nitrito no sangue total após o exercício. Desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de NO resulta em estresse oxidativo que promove disfunção endotelial. Nos nossos resultados encontramos que o exercício reduziu significativamente as concentrações plasmáticas de MDA em doentes com síndrome metabólica. A redução dos níveis de MDA,



que é um índice de estresse oxidativo, pode refletir redução do estresse oxidativo e, conseqüentemente, o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e melhora da atividade da eNOS (Hogg and Kalyanaraman 1999). Recente estudo clínico sugere que exercício físico de alta intensidade aumenta os níveis de estresse oxidativo e que o exercício moderado induz a uma vasodilatação através do aumento na biodisponibilidade de NO em indivíduos saudáveis (Goto et al. 2007). Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que o exercício aumenta a expressão da eNOS que resulta em aumento dos metabólitos do NO, como por exemplo o nitrito.

Algumas limitações do nosso estudo devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o nosso número de pacientes em cada grupo é pequeno e isto pode limitar o poder de detectar as diferenças entre os grupos. Em segundo lugar, a influência genética entre os grupos que não foi avaliada. Já foi demonstrado que existem polimorfismos no gene da eNOS que podem reduzir a sua atividade, e polimorfismos de outros genes que estão associados aos componentes da síndrome metabólica também podem modular as respostas ao exercício. Em terceiro lugar, as concentrações de nitrito nas hemácias poderiam confirmar os nossos resultados encontrados no sangue total. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos benéficos do exercício em pacientes com síndrome metabólica.

## **5- CONCLUSÃO**

Nossos dados sugerem que a biodisponibilidade do NO está prejudicada e que o estresse oxidativo está aumentado em pacientes com Síndrome Metabólica, os quais foram parcialmente revertidos pelo exercício físico. Esses efeitos bioquímicos promovidos pelo exercício físico foram associados com redução dos níveis circulantes de um inibidor endógeno da síntese do NO, e pode explicar parte dos efeitos benéficos cardiovasculares encontrados depois dos três meses de exercício físico.

## **6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Andreopoulos, S., and A. Papapetropoulos. 2000. Molecular aspects of soluble guanylyl cyclase regulation. *Gen Pharmacol* 34 (3):147-157.
- Barnard, R. J., E. J. Ugiaskis, D. A. Martin, and S. B. Inkeles. 1992. Role of diet and exercise in the management of hyperinsulinemia and associated atherosclerotic risk factors. *Am J Cardiol* 69 (5):440-444.
- Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, A. Szuba, P. S. Tsao, J. R. Chan, O. Tangphao, T. F. Blaschke, and J. P. Cooke. 1998. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98 (18):1842-1847.
- Cooke, J. P., and V. J. Dzau. 1997. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48:489-509.
- Davies, P. F. 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75 (3):519-560.
- Davis, K. L., E. Martin, I. V. Turko, and F. Murad. 2001a. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:203-236.
- Davis, M. E., H. Cai, G. R. Drummond, and D. G. Harrison. 2001b. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89 (11):1073-1080.
- Dejam, A., C. J. Hunter, M. M. Pelletier, L. L. Hsu, R. F. Machado, S. Shiva, G. G. Power, M. Kelm, M. T. Gladwin, and A. N. Schechter. 2005. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 106 (2):734-739.
- Dudzinski, D. M., J. Igarashi, D. Greif, and T. Michel. 2006. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:235-276.
- Durstine, J. L., P. W. Grandjean, P. G. Davis, M. A. Ferguson, N. L. Alderson, and K. D. DuBose. 2001. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. *Sports Med* 31 (15):1033-1062.

Eckel, R. H., S. M. Grundy, and P. Z. Zimmet. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* 365 (9468):1415-1428.

Eckel, R. H., R. Kahn, R. M. Robertson, and R. A. Rizza. 2006. Preventing cardiovascular disease and diabetes: a call to action from the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Diabetes Care* 29 (7):1697-1699.

Ekelund, U., S. Brage, P. W. Franks, S. Hennings, S. Emms, and N. J. Wareham. 2005. Physical activity energy expenditure predicts progression toward the metabolic syndrome independently of aerobic fitness in middle-aged healthy Caucasians: the Medical Research Council Ely Study. *Diabetes Care* 28 (5):1195-1200.

Ellis, G., I. Adatia, M. Yazdanpanah, and S. K. Makela. 1998. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31 (4):195-220.

Ford, E. S. 2005. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care* 28 (11):2745-2749.

Goto, C., Y. Higashi, M. Kimura, K. Noma, K. Hara, K. Nakagawa, M. Kawamura, K. Chayama, M. Yoshizumi, and I. Nara. 2003. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation* 108 (5):530-535.

Goto, C., K. Nishioka, T. Umemura, D. Jitsuiki, A. Sakaguchi, M. Kawamura, K. Chayama, M. Yoshizumi, and Y. Higashi. 2007. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens* 20 (8):825-830.

Green, D., C. Cheetham, L. Mavaddat, K. Watts, M. Best, R. Taylor, and G. O'Driscoll. 2002. Effect of lower limb exercise on forearm vascular function: contribution of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (3):H899-907.

Green, D. J., W. Bilsborough, L. H. Naylor, C. Reed, J. Wright, G. O'Driscoll, and J. H. Walsh. 2005. Comparison of forearm blood flow responses to incremental handgrip and cycle ergometer exercise: relative contribution of nitric oxide. *J Physiol* 562 (Pt 2):617-628.

Grundy, S. M. 2006. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov* 5 (4):295-309.

Grundy, S. M., H. B. Brewer, Jr., J. I. Cleeman, S. C. Smith, Jr., and C. Lenfant. 2004a. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2):e13-18.

Grundy, S. M., B. Hansen, S. C. Smith, Jr., J. I. Cleeman, and R. A. Kahn. 2004b. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation* 109 (4):551-556.

Hanson, R. L., G. Imperatore, P. H. Bennett, and W. C. Knowler. 2002. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 51 (10):3120-3127.

Higashi, Y., and M. Yoshizumi. 2004. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther* 102 (1):87-96.

Hirata, Y., M. Ishii, H. Matsuoka, T. Sugimoto, M. Iizuka, Y. Uchida, T. Serizawa, H. Sato, O. Kohmoto, T. Mochizuki, and et al. 1987. Plasma concentrations of alpha-human atrial natriuretic polypeptide and cyclic GMP in patients with heart disease. *Am Heart J* 113 (6):1463-1469.

Hogg, N., and B. Kalyanaraman. 1999. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1411 (2-3):378-384.

Hornig, B., V. Maier, and H. Drexler. 1996. Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 93 (2):210-214.

Isomaa, B., P. Almgren, T. Tuomi, B. Forsen, K. Lahti, M. Nissen, M. R. Taskinen, and L. Groop. 2001. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24 (4):683-689.

Katzmarzyk, P. T., A. S. Leon, J. H. Wilmore, J. S. Skinner, D. C. Rao, T. Rankinen, and C. Bouchard. 2003. Targeting the metabolic syndrome with exercise: evidence from the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 35 (10):1703-1709.

Kelm, M. 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411 (2-3):273-289.

Kelm, M., H. Preik-Steinhoff, M. Preik, and B. E. Strauer. 1999. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 41 (3):765-772.

Kiechle, F. L., and T. Malinski. 1993. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol* 100 (5):567-575.

Kim, H. P., S. W. Ryter, and A. M. Choi. 2006. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:411-449.

Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Jax, S. Kerber, P. Gharini, J. Balzer, R. B. Zotz, R. E. Scharf, R. Willers, A. N. Schechter, M. Feelisch, and M. Kelm. 2006. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 40 (2):295-302.

Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Rassaf, A. Schindler, O. Picker, T. Scheeren, A. Godecke, J. Schrader, R. Schulz, G. Heusch, G. A. Schaub, N. S. Bryan, M. Feelisch, and M. Kelm. 2003. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35 (7):790-796.

Kojda, G., and R. Hambrecht. 2005. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67 (2):187-197.

Laaksonen, D. E., H. M. Lakka, L. K. Niskanen, G. A. Kaplan, J. T. Salonen, and T. A. Lakka. 2002. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 156 (11):1070-1077.



Lakka, H. M., D. E. Laaksonen, T. A. Lakka, L. K. Niskanen, E. Kumpusalo, J. Tuomilehto, and J. T. Salonen. 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Jama* 288 (21):2709-2716.

LaMonte, M. J., C. E. Barlow, R. Jurca, J. B. Kampert, T. S. Church, and S. N. Blair. 2005. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation* 112 (4):505-512.

Lauer, T., M. Preik, T. Rassaf, B. E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch, and M. Kelm. 2001. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (22):12814-12819.

Leon, A. S., and O. A. Sanchez. 2001. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc* 33 (6 Suppl):S502-515; discussion S528-509.

Maeda, S., T. Miyauchi, T. Kakiyama, J. Sugawara, M. Iemitsu, Y. Irukayama-Tomobe, H. Murakami, Y. Kumagai, S. Kuno, and M. Matsuda. 2001. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. *Life Sci* 69 (9):1005-1016.

Maeda, S., T. Tanabe, T. Otsuki, J. Sugawara, M. Iemitsu, T. Miyauchi, S. Kuno, R. Ajisaka, and M. Matsuda. 2004. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res* 27 (12):947-953.

Malik, S., N. D. Wong, S. S. Franklin, T. V. Kamath, G. J. L'Italien, J. R. Pio, and G. R. Williams. 2004. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 110 (10):1245-1250.

Metzger, I. F., J. T. Sertorio, and J. E. Tanus-Santos. 2006. Relationship between systemic nitric oxide metabolites and cyclic GMP in healthy male volunteers. *Acta Physiol (Oxf)* 188 (2):123-127.

Mittermayer, F., J. Pleiner, K. Krzyzanowska, G. F. Wiesinger, M. Francesconi, and M. Wolzt. 2005. Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr* 117 (23-24):816-820.

Moncada, S., and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329 (27):2002-2012.

Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 (2):109-142.

Moro, M. A., R. J. Russel, S. Cellek, I. Lizasoain, Y. Su, V. M. Darley-USmar, M. W. Radomski, and S. Moncada. 1996. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (4):1480-1485.

Nathan, C., and Q. W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78 (6):915-918.

Ninomiya, J. K., G. L'Italien, M. H. Criqui, J. L. Whyte, A. Gamst, and R. S. Chen. 2004. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 109 (1):42-46.

Richter, B., A. Niessner, M. Penka, M. Grdic, S. Steiner, B. Strasser, S. Ziegler, G. Zorn, G. Maurer, V. Simeon-Rudolf, J. Wojta, and K. Huber. 2005. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost* 94 (6):1306-1311.

Sessa, W. C., K. Pritchard, N. Seyedi, J. Wang, and T. H. Hintze. 1994. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74 (2):349-353.

Stern, M. P., K. Williams, C. Gonzalez-Villalpando, K. J. Hunt, and S. M. Haffner. 2004. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 27 (11):2676-2681.

Tannenbaum, S. R. 1979. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science* 205 (4413):1332, 1334-1337.

Thompson, P. D., D. Buchner, I. L. Pina, G. J. Balady, M. A. Williams, B. H. Marcus, K. Berra, S. N. Blair, F. Costa, B. Franklin, G. F. Fletcher, N. F. Gordon, R. R. Pate, B. L. Rodriguez, A. K. Yancey, and N. K. Wenger. 2003. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 107 (24):3109-3116.

Traub, O., and B. C. Berk. 1998. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (5):677-685.

Traub, O., B. C. Berk, M. E. Davis, H. Cai, G. R. Drummond, and D. G. Harrison. 1998. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force

Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (5):677-685.

Valkonen, V. P., H. Paiva, J. T. Salonen, T. A. Lakka, T. Lehtimaki, J. Laakso, R. Laaksonen, R. H. Boger, S. M. Bode-Boger, A. Szuba, P. S. Tsao, J. R. Chan, O. Tangphao, T. F. Blaschke, and J. P. Cooke. 2001. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine

Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Lancet* 358 (9299):2127-2128.

Vallance, P., A. Leone, A. Calver, J. Collier, and S. Moncada. 1992. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 12:S60-62.

## **7- 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.

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.

4- 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:**

5- 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.

6- Este é somente um convite e de forma alguma você está obrigado a participar.

7- 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.

8- 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.

9- 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)