



Universidad de Oviedo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

***Marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular:
efecto del ejercicio físico y del entrenamiento***

Tesis Doctoral

Gracia Valcárcel Piedra

2015



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular: efecto del ejercicio físico y del entrenamiento	Inglés: Biochemical markers of cardiovascular risk: effects of exercise and training

2.- Autor	
Nombre: Gracia Valcárcel Piedra	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental)	
Órgano responsable: Química Física y Analítica	

RESUMEN (en español)

El objetivo principal del trabajo es el estudio del efecto producido por el ejercicio físico agudo y la influencia del entrenamiento en factores de riesgo cardiovascular de tipo bioquímico tanto tradicionales como emergentes, como las apolipoproteínas A-I y B, la lipoproteína(a), la homocisteína y la proteína C reactiva ultrasensible y la dimetilarginina asimétrica.

Un grupo de deportistas semiprofesionales fue estudiado a lo largo de la temporada deportiva. Las muestras analizadas fueron obtenidas en diferentes momentos de la temporada de entrenamientos (baja y alta intensidad), antes y después de la realización de una prueba de esfuerzo físico agudo. Para llevar a cabo el estudio analítico, ha sido necesario el desarrollo de parte de la metodología empleada. Además de los factores de riesgo cardiovascular de tipo lipídico se han evaluado las alteraciones del equilibrio tiol-redox que se producen como consecuencia de la realización de ejercicio, estudiando el equilibrio entre las formas reducidas y oxidadas de la homocisteína. También se ha valorado el efecto del ejercicio sobre el proceso inflamatorio a través de la proteína C reactiva ultrasensible y sobre la función endotelial estudiando el efecto del ejercicio en los niveles circulantes de la dimetilarginina asimétrica.

RESUMEN (en Inglés)

The main objective of this study is to test the effect of acute exercise and training influence on cardiovascular risk factors of both traditional and emerging biochemical type such as apolipoproteins AI and B, lipoprotein (a), homocysteine and C-reactive protein and asymmetric dimethylarginine.

A group of semi-professional athletes was studied along the sports season. The samples analyzed were obtained at different times of the season workouts (low and high intensity) before and after performing a test of acute physical effort. To carry out the analytical study has required the development of methodology. In addition to lipid cardiovascular risk factors changes have been evaluated thiol-redox status that occur as a result of carrying out exercise, considering the balance between reduced and oxidized forms of homocysteine. It has also assessed the effect of exercise on inflammatory process through ultrasensitive C-reactive protein and endothelial function studying the effect of exercise on circulating levels of asymmetric dimethylarginine.

A Fran

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Rafael Venta Obaya, bajo cuya dirección se ha realizado esta tesis doctoral. Por la generosidad y confianza mostradas al ofrecerme esta oportunidad, por todo el apoyo que me ha dado, por todo lo que me ha enseñado en estos años, por su tiempo y dedicación, por su infinita paciencia... Gracias.

Al Dr. Nicolás Terrados del Departamento de Medicina Deportiva de la Fundación Deportiva Municipal de Avilés, por toda su colaboración.

A los deportistas que han participado en este proyecto.

A todo el personal del laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital San Agustín de Avilés, que me han acompañado en buena parte de este proyecto y de los que guardaré siempre los mejores recuerdos.

A Ángel Mones, responsable de la biblioteca del Hospital V. Álvarez Buylla de Mieres, por su extraordinaria ayuda con la intensa labor bibliográfica.

A Sandra, porque si no fuera por ella, nada sería como es.

A Zoraida, mi compañera de fatigas... que ha sido un pie más en este largo camino. Gracias por tu amistad y tu apoyo, sin el que todo hubiera sido mucho más difícil.

A mis amigos, aquellos que no saben muy bien qué es esto de la homocisteína con lo que llevo media vida, porque siempre están a mi lado, sobre todo cuando lo que necesito es olvidarme de todo durante un rato.

A mi familia, que siempre ha sido un gran apoyo. A mi tío, que siempre me ha animado a seguir.

A mi padre, por todas las cosas buenas que ha ido poniendo en mi camino.

A mi madre, Ana, la persona más importante de estas líneas, a la que se lo debo todo y por la que he llegado hasta aquí, siendo muy consciente de su esfuerzo, gracias.

A Fran, que lo ha completado todo de la mejor manera posible. Prepárate, porque ahora sí que empieza lo bueno...

Índice

Introducción.....	19
I. Enfermedad cardiovascular	21
1. Aterosclerosis	23
1.1. El endotelio.....	23
1.2. Disfunción endotelial y aterogénesis.....	24
II. Factores de riesgo cardiovascular.....	27
III. Factores de riesgo cardiovascular lipídicos.....	33
1. Lípidos séricos.....	33
2. Triglicéridos	36
3. Apolipoproteínas	37
4. Lipoproteína (a).....	38
IV. Marcadores de inflamación: proteína C reactiva.....	41
V. Homocisteína.....	43
VI. Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica.....	47
1. Óxido nítrico.....	47
2. Dimetilarginina asimétrica	49
VII. El ejercicio físico.....	55
1. Bases metabólicas.....	55
2. Tipos de ejercicio	57
3. Efectos del ejercicio físico	58
3.1. Respuesta aguda	58
3.2. Efecto del entrenamiento.....	60
VIII. Marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular y ejercicio físico.....	61
1. Lípidos.....	62
2. Marcadores inflamatorios.....	64
3. Equilibrio tiol-redox	65
4. Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica.....	66
Hipótesis de trabajo y objetivos	69
Material y métodos.....	75
I. Individuos.....	77
II. Muestras y conservación	79
III. Material e instrumentación	81
IV. Determinaciones analíticas.....	85
1. Métodos automatizados.....	85
2. Óxido nítrico.....	86
3. Homocisteína.....	86
4. Metilargininas.....	90
5. Arginina y citrulina	91

V.	Validación analítica.....	93
1.	Linealidad.....	93
2.	Sensibilidad.....	96
3.	Precisión intraensayo e interensayo.....	96
4.	Recuperación.....	97
VI.	Corrección de la hemoconcentración.....	99
VII.	Análisis estadístico de los datos.....	101
Resultados.....		103
I.	Corrección de la hemoconcentración.....	105
II.	Parámetros bioquímicos generales.....	107
III.	Marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular.....	111
1.	Lípidos.....	111
2.	Proteína C reactiva.....	114
3.	Homocisteína.....	116
4.	Óxido nítrico.....	119
5.	Metilargininas.....	121
IV.	Estudios de correlación.....	127
1.	Cambios con el ejercicio agudo.....	127
2.	Asociación entre las concentraciones pre-ejercicio y los cambios con el ejercicio agudo..	129
Discusión.....		131
I.	Hemoconcentración.....	133
II.	Parámetros bioquímicos generales.....	136
III.	Marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular.....	139
1.	Lípidos.....	139
2.	Proteína C reactiva.....	143
3.	Homocisteína y equilibrio tiol-redox.....	145
4.	Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica.....	149
Conclusiones.....		157
Bibliografía.....		163

AAC: American College of Cardiology
AccQ: carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimida
ADMA: dimetilarginina asimétrica
AHA: American Heart Association
apoA: apolipoproteína A-I
apoB: apolipoproteína B-100
CβS: cistationina-β-sintasa
CAT: transportadores de aminoácidos catiónicos
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
CETP: proteína transferidora de esteres de colesterol
cHDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
CK: creatina quinasa
cLDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad
CV: coeficiente de variación
DDAH: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa
ECA: enzima convertidora de angiotensina
EDRF: factor relajante derivado del endotelio
EDTA: ácido etilendiamino tetracético
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
FAD: falvin adenina dinucleotido
FMN: falvin mononucleotido
FRC: factor de riesgo cardiovascular
GMPc: guanosin-3',5-monofosfato cíclico
GTP: guanosin trifosfato
Hb: hemoglobina
HCl: ácido clorhídrico
Hct: hematocrito
HDL: lipoproteínas de alta densidad
HEPES: ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
hnRNP: ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
ICAM: molécula de adhesión intercelular
IDL: lipoproteínas de densidad intermedia
IL-6: interleucina-6
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
JNC: Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure

LCAT: lecitina colesterol aciltransferasa
LDL: lipoproteínas de baja densidad
lHcy: homocisteína libre
L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metil éster
L-NNA: éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina
lp(a): lipoproteína (a)
LPL: lipoproteína lipasa
LURIC: Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health
MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
NaOH: hidróxido sódico
NCEP: National Cholesterol Education Program
NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey
NMMA: N^G-monometil-L-arginina
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
N-PLA: N-propil arginina
PBS: tampón fosfato salino
PCR: proteína C reactiva
PCRus: proteína C reactiva ultrasensible
PIPES: ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
PITC: fenilisotiocianato
PRMTs: proteína-arginina metiltransferasas
rHcy: homocisteína reducida
ROS: especies reactivas de oxígeno
SEQC: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
SBDF: 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato
SCORE: Systematic Coronary Risk Evaluation
SD: desviación estándar
SDMA: N^G,N^{G'}-dimetil-L-arginina simétrica
SEM: error estándar de la media
TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina
TEA: trietilamina
tHcy: homocisteína total
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TRIS: tri(hidroximetil)aminometano)

VCAM-1: molécula 1 de adhesión vascular

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

VO₂: consumo de oxígeno

VO_{2 max}: consumo máximo de oxígeno

Imagen 1. Corte de una arteria	23
Imagen 2. Fases de la aterosclerosis.....	25
Imagen 3. Metabolismo exógeno y endógeno de las lipoproteínas	34
Imagen 4. Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).	35
Imagen 5. Estructura de la lipoproteína (a)	39
Imagen 6. Homocisteína: formas mayoritarias en plasma humano	43
Imagen 7. Metabolismo de la homocisteína.	44
Imagen 8. Efectos del óxido nítrico en el sistema cardiovascular	47
Imagen 9. Síntesis del óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa.....	48
Imagen 10. Estructuras químicas de la L-arginina y de las metilargininas endógenas.....	50
Imagen 11. Biosíntesis y metabolismo del ADMA.....	50
Imagen 12. Esquema representativo del metabolismo del ADMA	51
Imagen 13. Sistemas energéticos que aportan energía para la contracción muscular.	56
Imagen 14. Cicloergómetro y kayak-ergómetro.....	59
Imagen 15. Esquema de obtención de muestras.....	79
Imagen 16. Esquema general de la determinación de homocisteína total y homocisteína reducida.....	88
Imagen 17. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de homocisteína total.	89
Imagen 18. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de homocisteína reducida.....	89
Imagen 19. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de metilargininas	92
Imagen 20. Estudio de linealidad de la homocisteína en una matriz acuosa y en una matriz de muestra real.....	94
Imagen 21. Estudio de linealidad de las metilargininas en una matriz acuosa y en una matriz de muestra real.....	95
Imagen 22. Variación porcentual (%) de los volúmenes de plasma (ΔVP) y sangre (ΔVS), tras la prueba de esfuerzo.	105
Imagen 23. Diagramas de caja que representan la variación de volumen de plasma con el ejercicio agudo, agrupados por deporte y temporada.....	106

Imagen 24. Variaciones de la concentración media±SEM de creatinina con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte.....	108
Imagen 25. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja y alta, separados por deporte.....	109
Imagen 26. Variaciones de la concentración media±SEM de triglicéridos con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte.....	112
Imagen 27. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja y alta, separados por deporte.....	113
Imagen 28. Variaciones de la mediana y amplitud intercuartílica de proteína C reactiva ultrasensible con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte	115
Imagen 29. Variaciones de las medianas y amplitud intercuartílica de las concentraciones de PCR ultrasensible antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja y alta, separados por deporte.....	115
Imagen 30. Variaciones de la concentración media±SEM o mediana y amplitud intercuartílica de homocisteína con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte.....	117
Imagen 31. Variaciones de las concentraciones medias±SEM de homocisteína y medianas y amplitud intercuartílica de homocisteína reducida/total, en temporada baja y alta, separados por deporte	118
Imagen 32. Variaciones de la concentración media±SEM de óxido nítrico expresadas como nitratos y nitritos (NO _x) con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte	119
Imagen 33. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja y alta, separados por deporte.....	120
Imagen 34. Variaciones de la concentración media±SEM de L-arginina y L-citulina con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte	122
Imagen 35. Variaciones de la concentración media±SEM de metilargininas y ratios relacionados con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento y el deporte	123
Imagen 36. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja y alta, separados por deporte.....	125

Tabla 1. Factores de riesgo cardiovascular.....	28
Tabla 2. Clasificación y características de las lipoproteínas	33
Tabla 3. Clasificación de las proteína-arginina metiltransferasas	51
Tabla 4. Datos antropométricos de los individuos participantes.	77
Tabla 5. Datos específicos de la determinación de algunas magnitudes.	85
Tabla 6. Precisión intra (CV_{intra}) e interensayo (CV_{inter}) de los métodos cromatográficos.....	96
Tabla 7. Recuperación (%) obtenida como (concentración total - concentración muestra)/concentración añadida.....	97
Tabla 8. Fórmulas para la valoración de los cambios de los volúmenes circulantes.....	99
Tabla 9. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación de parámetros bioquímicos generales.....	107
Tabla 10. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación de lípidos.	111
Tabla 11. PCR ultrasensible pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación.....	114
Tabla 12. Homocisteína pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación.....	116
Tabla 13. Óxido nítrico expresado como concentración de nitratos y nitritos pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación.....	119
Tabla 14. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación de L-arginina, L-citrulina y metilargininas.....	121
Tabla 15. Correlación entre los porcentajes de variación antes y después del ejercicio	128
Tabla 16. Correlación entre las concentraciones pre-ejercicio y las variaciones con el ejercicio	129

Introducción

I. Enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares constituyen un problema de salud de primer orden, siendo la primera causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados. En el año 2012 en todo el mundo 17,5 millones de muertes se debieron a enfermedades cardiovasculares¹. Además, cinco de las diez principales amenazas mundiales para la salud están relacionadas con enfermedades del sistema circulatorio como la hipertensión arterial, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la hipercolesterolemia y la obesidad o el sobrepeso².

Las enfermedades del sistema circulatorio constituyen también la primera causa de muerte en la población española. En 2013, último año para el que hay datos publicados, causaron 117.484 muertes, lo que supone el 30,1% de todas las defunciones, con una tasa bruta de mortalidad por 100.000 habitantes de 233 en varones y de 270 en mujeres, destacando en ambos sexos como primera causa de muerte la enfermedad cerebrovascular³.

La enfermedad isquémica del corazón, la enfermedad cerebrovascular y la arteriopatía periférica son las principales alteraciones del sistema circulatorio, de origen principalmente aterotrombótico². Además, la insuficiencia cardiaca es un síndrome en el que desembocan numerosas enfermedades cardiovasculares, como la propia cardiopatía isquémica². Los avances en biología vascular han permitido un mejor conocimiento de los mecanismos que conducen al desarrollo de la placa de ateroma. Las alteraciones de la pared vascular, la trombosis y las lipoproteínas plasmáticas han sido identificadas como los principales mediadores que intervienen en la formación de estas lesiones⁴ y se ha sugerido que los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno están involucrados en la fisiopatología de estas enfermedades⁵.

En las últimas décadas ha despertado un enorme interés el estudio de los mecanismos que subyacen a los diferentes factores de riesgo cardiovascular, así como, de las estrategias para la prevención primaria y secundaria. En este sentido, se han publicado diversos estudios que evidencian la reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular en función de la práctica habitual de ejercicio físico^{6,7,8}. Esto ha dado lugar a designar a la inactividad física como factor de riesgo cardiovascular (FRC)⁹.

Se ha demostrado ampliamente que la actividad física o la buena forma física disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular y que tiene capacidad para reducir la inflamación crónica vascular, que juega un importante papel en el proceso aterogénico^{8,10}. Se ha descrito también que el entrenamiento produce una mejora en la vasodilatación dependiente del endotelio, como consecuencia de la inducción de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y por tanto, de los niveles de óxido nítrico (NO), lo que se ha identificado como un mecanismo que explica los numerosos beneficios de la práctica de ejercicio físico, tanto en individuos sanos como en diferentes condiciones patológicas^{6,11}.

Además de los efectos sobre la presión arterial^{12,13}, existen otros mecanismos a través de los cuales el ejercicio físico regular reduce el riesgo cardiovascular, efectos positivos sobre la composición corporal, perfil lipoproteico¹⁴, sensibilidad a la insulina¹⁵, así como factores psicosociales. Además, existen evidencias de que la práctica de ejercicio aeróbico regular puede inhibir la progresión de lesiones coronarias y, en algunos casos, se observa regresión de la enfermedad en pacientes que han modificado sus FRC y practican ejercicio aeróbico regularmente¹⁶.

1. Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad progresiva que se caracteriza por la presencia de placas fibroadiposas generadas por la acumulación de material lipídico y elementos celulares, como macrófagos y células musculares lisas, en la capa íntima de las arterias de mediano y gran calibre (especialmente en aorta, arterias coronarias y arterias cerebrales). Estas placas de ateroma pueden llegar a ocupar toda la luz arterial, comprometiendo la funcionalidad circulatoria. La estenosis del vaso dificulta la llegada de sangre a los tejidos irrigados, disminuyendo el aporte de oxígeno (isquemia). En lesiones avanzadas se puede producir trombosis, lo que puede provocar la oclusión del vaso, cesando la irrigación al tejido, el cual se necrosa (infarto). Las placas de ateroma pueden producir también un debilitamiento progresivo de la pared de la arteria, que puede dilatarse (aneurisma) hasta romperse y producir una hemorragia¹⁷.

1.1. El endotelio

La arteria normal consta de tres capas: a) la túnica externa o adventicia, compuesta de fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos, vasos nutrientes de la arteria, nervios y conductos linfáticos, b) la túnica media, constituida por abundantes células musculares lisas y c) la túnica interna o íntima, formada por tejido conectivo con algunas células musculares lisas y revestida de una monocapa de células endoteliales (Imagen 1).

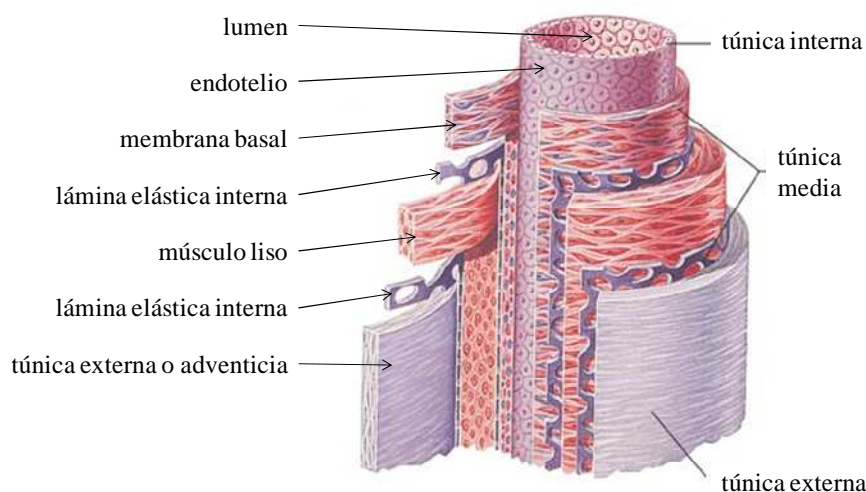


Imagen 1. Corte de una arteria.

El endotelio es una monocapa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos y linfáticos, las cavidades serosas y el corazón, donde se denomina endocardio. Las células endoteliales son de tipo epitelio plano simple y con su eje mayor paralelo a la luz del vaso. En ellas destaca la

existencia de pequeños poros o hendiduras intercelulares a través de las que difunden moléculas de agua y la mayor parte de iones hidrosolubles y solutos pequeños, así como un gran número de vesículas denominadas del plasmalema, que son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática que se mueven a través de la célula endotelial¹⁸.

Es una estructura que se encuentra en estrecho contacto con su entorno y responde a estímulos de forma dinámica y metabólicamente activa, permitiendo mantener la homeostasis vascular a través de múltiples interacciones entre las células endoteliales y la luz del vaso.

El endotelio regula el tono vascular mediante la producción de moléculas vasodilatadoras como el NO y la prostaciclina, y de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina o la angiotensina II. Asimismo, posee propiedades antitrombóticas debido a que en su superficie luminal, el heparán se asocia a la antitrombina III y la activa, previniendo la activación de la trombina. El endotelio también expresa proteínas de membrana que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de monocitos y linfocitos T. Estas moléculas son selectinas (E-selectina, P-selectina y L-selectina) y proteínas pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas, como la molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1 y 2 de adhesión intercelular (ICAM-1 e ICAM-2)¹⁹. El mantenimiento de un balance adecuado de estas sustancias por parte del endotelio le permite ejercer numerosas funciones homeostáticas como^{19,20,21}:

- a) la regulación del tono vascular a través de una producción balanceada de factores vasodilatadores y vasoconstrictores,
- b) el mantenimiento de la fluidez y la coagulación de la sangre mediante la producción de factores que regulan la actividad plaquetaria y la cascada de coagulación,
- c) el sistema fibrinolítico y la producción de citocinas y moléculas de adhesión.

El conjunto de estas funciones se conoce como función endotelial y se expresa a través de una óptima dilatación del tejido vascular y la capacidad de prevenir vasoconstricción anormal, siendo capaz de evitar el desarrollo de patologías como la aterosclerosis.

Las anomalías de alguna de las vías metabólicas que regulan la función endotelial, conducen a la disfunción endotelial, que es característica de la enfermedad cardiovascular y que frecuentemente se presenta asociada a los diferentes factores de riesgo cardiovascular (hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión arterial, obesidad...), siendo un importante factor pronóstico de mortalidad y morbilidad cardiovascular²².

1.2. *Disfunción endotelial y aterogénesis*

La arteriosclerosis se define como un engrosamiento y endurecimiento arterial difuso por fibrosis con mayor o menor depósito de calcio. Cuando el endurecimiento y engrosamiento de la

íntima se acompañada de acumulación de grasa y capas de fibra de colágeno en distintas proporciones en forma de placa de ateroma, recibe el nombre de aterosclerosis^{23,24}.

Se ha descrito que el proceso aterogénico de la pared arterial se produce en tres etapas principales: la primera de ellas sería la disfunción endotelial y la formación de una estría grasa^{24,25}. La segunda, la formación de la placa fibrosa y, por último, los estadios más avanzados de la lesión aterosclerótica implican muerte celular, rotura de las placas, calcificación y procesos trombóticos^{24,26,27,28} (Imagen 2).

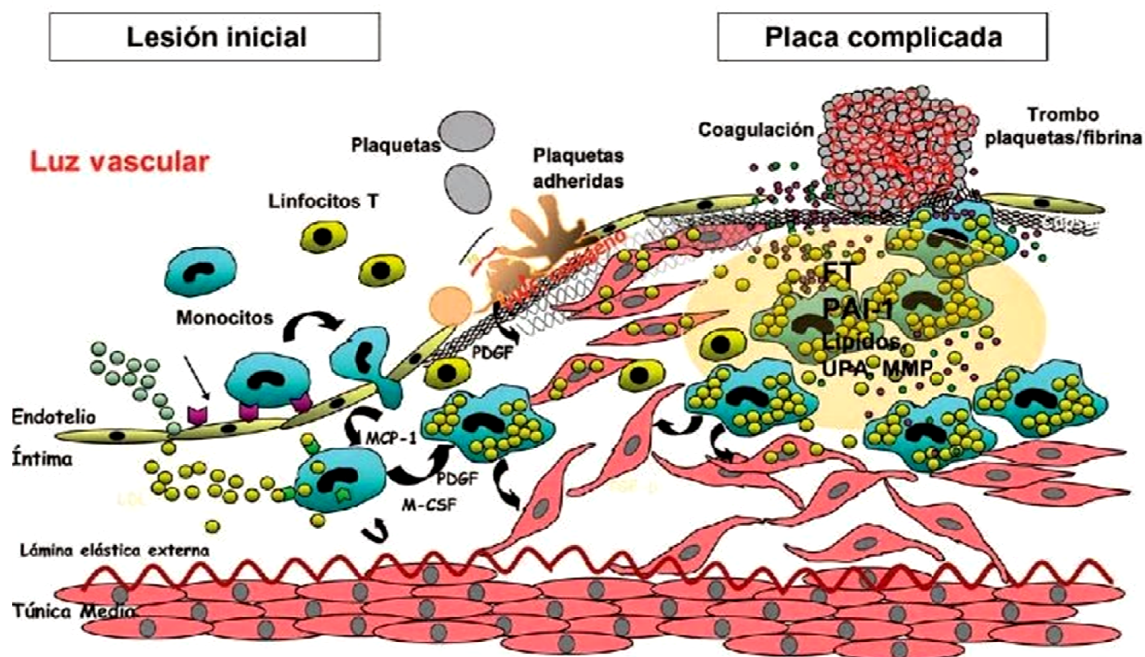


Imagen 2. Fases de la aterosclerosis²⁹.

En condiciones normales, el endotelio vascular forma una barrera relativamente impermeable que responde a estímulos generados sistémica o localmente y puede alterar su estado funcional adaptándose para contribuir a una homeostasis normal. Sin embargo, algunas alteraciones pueden ocasionar cambios localizados de las interacciones del endotelio con componentes circulantes. Estos cambios dan lugar a una permeabilidad aumentada a macromoléculas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y su acumulación en la matriz subendotelial, con su consiguiente oxidación, hiperadherencia de los leucocitos, desequilibrios funcionales de factores pro y antitrombóticos locales, estimuladores e inhibidores del crecimiento y sustancias vasoactivas. Estas manifestaciones constituyen la denominada disfunción endotelial y es el primer paso al fenómeno de la aterosclerosis^{24,30,31}.

Las LDL y otros componentes del plasma pueden entrar y salir de la matriz subendotelial, pero cuando existe un exceso de LDL circulante este transporte hacia el interior aumenta, así como la retención de las mismas. Las LDL que difunden a través del endotelio pueden quedar retenidas en la íntima, posiblemente debido a una interacción entre la molécula de apolipoproteína B-100 (apoB) y

los proteoglicanos de la matriz³². Del mismo modo, otras partículas que contienen apoB como la lipoproteína (a) [Lp(a)] y los remanentes de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) también son susceptibles de este atrapamiento y se consideran aterogénicas. Las LDL sufren modificaciones (oxidación, lipólisis, proteólisis...) por parte de los radicales libres generados por la actividad metabólica de las células endoteliales²⁷.

La lesión aterosclerótica se inicia tras la respuesta inflamatoria a la entrada de estas moléculas. Las LDL mínimamente oxidadas suponen un estímulo proinflamatorio sobre el endotelio, induciendo la expresión de moléculas que afectan al reclutamiento de las células inflamatorias. La sobreexpresión endotelial de selectinas, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y la inducción de proteínas quimiotácticas (MCP-1) y factores estimuladores de colonias (GM-CSF) favorecen el reclutamiento de monocitos, su migración y posterior diferenciación a macrófagos^{33,34}.

Los macrófagos captan los lípidos que han sufrido modificaciones oxidativas a través de receptores específicos y se convierten en células espumosas y liberando factores de crecimiento que promueven la proliferación y migración de células musculares lisas desde la capa media hacia la íntima³³. Las células musculares lisas participan activamente en la producción de matriz extracelular, originando una capa fibrosa que dará estabilidad a la placa²⁷. Este conjunto de procesos provoca la estimulación de la respuesta inmune local y la manifestación de efectos a distancia, como la producción de la proteína C reactiva (PCR) en el hígado.

En fases más avanzadas, si el estímulo inflamatorio persiste, se produce la secreción por parte de los macrófagos de moléculas proinflamatorias y proteolíticas que inducen cambios en la composición de la placa de ateroma, con formación de un núcleo necrótico y adelgazamiento de la capa fibrosa. La estabilidad de una placa se basa en la integridad de la placa fibrosa y la resistencia de los materiales de la matriz extracelular. Las placas más vulnerables presentan un casquete fibroso fino, un núcleo rico en lípidos y células inflamatorias²⁷. La ruptura de la placa da lugar a la exposición de los componentes sanguíneos al factor tisular, iniciación de la coagulación, captación de plaquetas y a la formación del trombo²⁷.

Las superficies de las lesiones complicadas pueden convertirse en trombogénicas debido a la pérdida de las células endoteliales y a la exposición del espacio subendotelial. Las plaquetas se adhieren a esta superficie expuesta, promoviendo la formación del trombo. También se puede formar una fisura en las placas inestables que conllevaría a la formación de un trombo mayor^{27,28}.

Las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden acarrear síntomas isquémicos como resultado de un estrechamiento progresivo de la luz arterial. Las consecuencias agudas de la enfermedad cardiovascular, como el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular, generalmente son el resultado de la ruptura de la placa y la trombosis^{35,36}.

II. Factores de riesgo cardiovascular

Aunque está bien establecido que la aterosclerosis tiene una base etiopatogénica multifactorial, la hipótesis más aceptada considera esta enfermedad como el resultado de una respuesta inflamatoria crónica a diferentes mecanismos de lesión de la pared vascular, asociados a múltiples FRC²³.

Un FRC es una característica biológica o una conducta que aumenta la probabilidad de padecer o morir de enfermedad cardiovascular en aquellos individuos que la presentan³⁷. El concepto de factor de riesgo fue introducido en el Estudio Framingham³⁸ hace más de 50 años. Desde entonces, los avances en el área de la epidemiología han permitido realizar estudios en grandes poblaciones y se han podido identificar una serie de FRC que actuarían como inductores de la formación de la placa de ateroma. Para aceptar o establecer que una determinada característica biológica, factor ambiental o hábito es un FRC, se requiere que tenga un método de medida estandarizado, que los estudios prospectivos sean concordantes, que haya un efecto aditivo cuando en un individuo concurren varios factores de riesgo y que la modificación del factor, en el caso de que sean factores modificables, se acompañe de una disminución del riesgo^{23,39}.

Se han publicado numerosos documentos e informes de recomendaciones para la prevención de las enfermedades cardiovasculares y para el control de los principales FRC, elaborados por organismos, instituciones o sociedades científicas nacionales e internacionales^{40,41,42,43,44,45}.

En 1999, Grundy⁹ realizó una clasificación de los FRC dividiéndolos en tres grupos: mayores o causales, predisponentes y condicionales. Por otra parte desde el punto de vista clínico, los FRC también pueden clasificarse de acuerdo a que sean FRC modificables o no modificables. Aunque ambas clasificaciones son válidas, la mayoría de los autores clasifican los FRC según sean clásicos o emergentes, de acuerdo con la clasificación realizada en el panel III del National Cholesterol Education Program (NCEP)⁴¹.

Por otra parte, los FRC también se puede clasificar de acuerdo al tipo de característica biológica siendo esta la clasificación que seguiremos en esta exposición (Tabla 1).

Factores constitucionales

Entre los factores constitucionales relacionados con el riesgo cardiovascular, se encuentran los antecedentes familiares de enfermedad coronaria, la edad, el sexo y la raza. Se considera historia familiar de enfermedad coronaria precoz la presencia de enfermedad arterial sintomática en un familiar de primer grado menor de 55 años si es varón, o menor de 65 años si es mujer⁴⁶. Por otra parte, la incidencia de enfermedad cardiovascular aumenta con la edad independientemente de otros FRC y el riesgo de cardiopatía isquémica es cuatro veces mayor en el hombre que en la mujer⁴⁷. En cuanto a la raza, los individuos de raza negra tiene dos veces más probabilidades de presentar

enfermedad cardiovascular que la raza caucasiana y la incidencia es similar entre hispanos y caucásicos²³.

Factores de riesgo clásicos		
No modificables		
Factores constitucionales		Antecedente familiar de enfermedad coronaria precoz Edad Sexo Raza
Modificables		
Factores relacionados con el estilo de vida		Estrés Dieta aterogénica Sobrepeso/obesidad Sedentarismo Hábito tabáquico
Factores hemodinámicos		Hipertensión arterial
Factores metabólicos		Diabetes mellitus Aumento del colesterol LDL Disminución del colesterol HDL
Factores de riesgo emergentes		
Factores metabólicos		Colesterol total/colesterol HDL Apolipoproteínas Triglicéridos Partículas de LDL “pequeñas y densas” Lipoproteína(a) Proteína C reactiva ultrasensible Homocisteína Dimetilarginina asimétrica

Tabla 1. Factores de riesgo cardiovascular. LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad.

Factores relacionados con el estilo de vida

La enfermedad cardiovascular está fuertemente relacionada con factores relacionados con el estilo de vida, especialmente con el consumo de tabaco, los hábitos alimentarios poco saludables, la inactividad física y el estrés psicosocial⁴⁷. La exposición mantenida al estrés psíquico, produce una liberación de catecolaminas, que es responsable de una respuesta hipertensiva y de un mayor riesgo de arritmias²³. Además el tabaco se ha demostrado como un potente contribuyente al riesgo de enfermedad cardiovascular. La relación entre el tabaco y este riesgo es dependiente de la dosis y se observa tanto en hombres como en mujeres. Los estudios observacionales sugieren que el abandono del hábito tabáquico se acompaña de una reducción sustancial del riesgo de eventos cardiovasculares⁴¹.

Por otra parte, el sedentarismo es un FRC para el que se ha demostrado una relación lineal inversa entre la cantidad de actividad física realizada y la mortalidad por cualquier causa⁴⁸. La participación en una actividad física regular disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular⁴⁹.

Desde un punto de vista metabólico la inactividad física se relaciona con la resistencia a la insulina, aumento del riesgo trombótico y dislipemia⁵⁰.

Factores hemodinámicos

La hipertensión es un FRC principal e independiente cuyo efecto perjudicial se potencia cuando se asocia a otros FRC como el tabaco, la diabetes y las dislipemias. El último informe de la Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC) mantiene la definición de hipertensión como una presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg o diastólica ≥ 90 mmHg^{51,52}. Diversos estudios, entre ellos el estudio Framingham, han mostrado un ascenso del riesgo de mortalidad total y cardiovascular al aumentar los niveles de presión arterial (diastólica y sistólica), siendo esta relación continua y gradual^{53,54,55}. Esta asociación se observa tanto en hombres como en mujeres y tanto en individuos jóvenes como ancianos.

Para las personas con hipertensión, los beneficios potenciales de una dieta saludable, del control del peso, y la realización de ejercicio regular son muy importantes. Estos cambios en el estilo de vida tienen el potencial de mejorar el control de la tensión arterial e incluso de reducir la necesidad de medicamentos. La JNC apoya las recomendaciones del American College of Cardiology (ACC) y American Heart Association (AHA) acerca de los cambios en el estilo de vida^{45,52}.

Por otra parte, la hipertrofia ventricular izquierda es la consecuencia fisiológica de la hipertensión arterial en el corazón que se convierte en una respuesta patológica debido a cambios bioquímicos y estructurales en el miocardio. Existen estudios que confirman que la presencia de hipertrofia ventricular izquierda representa un importante FRC independiente de la presión arterial²³.

Marcadores de tipo metabólico

El grupo más numeroso de FRC lo constituyen los marcadores metabólicos entre los que se encuentran FRC clásicos como la diabetes mellitus, el colesterol, con el aumento del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) o la disminución del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), así como una serie de marcadores metabólicos de más reciente aparición, entre los que se encuentran otros lípidos (apolipoproteínas, lp(a), triglicéridos), marcadores de inflamación como la PCR y otro tipo de marcadores como la homocisteína o la dimetilarginina asimétrica (ADMA). Estos FRC comparten mecanismos comunes por los que al final, la disfunción endotelial puede conducir a la formación de una placa y a su posterior evolución.

La posibilidad de medir los marcadores metabólicos representa una forma sencilla de evaluar el riesgo cardiovascular. Su naturaleza y facilidad de cuantificación permiten mediante una extracción de sangre, el control de forma directa del mayor número posible de FRC y la posibilidad de evaluar en ellos las modificaciones ocurridas a través de cambios en el estilo de vida de una forma sencilla, razón por la que este grupo de FRC ha sido el seleccionado para este trabajo.

La diabetes se define como la presencia de un nivel de glucosa en ayunas mayor o igual a 126 mg/dL⁵⁶. El riesgo de enfermedad cardiovascular se ve sustancialmente incrementado tanto en la diabetes mellitus tipo 1 como en la de tipo 2^{41,57}. El incremento del riesgo atribuido a la hiperglucemia es independiente de otros factores de riesgo como la obesidad o el sobrepeso y las dislipemias, frecuentemente observadas en individuos diabéticos.

El 80% de la mortalidad de los pacientes con diabetes mellitus se debe a complicaciones de la aterosclerosis, siendo la cardiopatía isquémica responsable del 75%⁵⁸. Se ha demostrado que el riesgo de infarto agudo de miocardio de un paciente con diabetes mellitus tipo 2 sin infarto previo es similar a la de los no diabéticos con infarto previo⁵⁹.

Exceptuando la diabetes mellitus, que no será objeto de este trabajo ya que en la selección de participantes para el estudio solo se incluirá a individuos sanos, el resto de los FRC asociados a modificaciones metabólicas mencionados, se detallan de forma pormenorizada en adelante.

Estratificación del riesgo

El Panel III identificaba ya entre los FRC tradicionales, aquellos relacionados con el estilo de vida, entre los que se incluyen el sobrepeso, el sedentarismo y la dieta aterogénica. En las nuevas guías de la ACC/AHA, se recomienda la modificación de los estilos de vida en todos los pacientes, independientemente del tratamiento hipocolesterolemizante que tengan pautado⁴⁵. Sin embargo, a pesar de que la evidencia científica para estos FRC está bien establecida, no computan para la estratificación ni para el cálculo del riesgo global, debido en parte a la dificultad para cuantificar su efecto y principalmente por su influencia sobre el resto de los FRC tradicionales que sí computan en la estratificación del riesgo individual.

Recientemente, las dos organizaciones más importantes que se ocupan de la salud cardiovascular en EE.UU., la ACC y la AHA, han publicado nuevas guías de manejo del riesgo cardiovascular^{43,44,45}. Según estas recomendaciones, el riesgo cardiovascular a 10 años se determina mediante las variables tradicionales: edad, colesterol total y cHDL, presión arterial sistólica (con o sin tratamiento hipertensivo), diabetes y tabaco.

Las tablas más utilizadas en la práctica clínica para estimar el riesgo cardiovascular global de un individuo son las que proceden del estudio de Framingham⁴¹ y las europeas derivadas del proyecto SCORE (Systematic Coronary Risk Evaluation)⁴⁷, que calculan el riesgo en base a los FRC tradicionales y clasifican a la población en distintas categorías de riesgo en función de la probabilidad de padecer un evento cardiovascular en los próximos 5-10 años. Los FRC tradicionales son capaces de explicar aproximadamente el 80% del riesgo poblacional y se ha demostrado que su control disminuye el riesgo cardiovascular entre un 35-50% a 5 años en población de alto riesgo⁶⁰. Sin embargo, los FRC tradicionales no explican completamente la aparición de la enfermedad cardiovascular, ya que, en torno al 20% de los accidentes coronarios sucede en individuos en los que no se detecta ninguno de

ellos, lo que representa una importante limitación⁶¹. Para mejorar la evaluación del riesgo de enfermedad cardiovascular, a lo largo de los últimos años han surgido estudios que proponen la introducción de FRC nuevos, no convencionales o emergentes^{40,41}, con la pretensión de que sean incorporados en la evaluación y estratificación del riesgo cardiovascular en los individuos y en las poblaciones. Algunos de ellos, han sido objeto de discusión y controversia y finalmente no se ha demostrado la utilidad de incluirlos entre los parámetros a tener en cuenta en la práctica clínica rutinaria para la evaluación del riesgo. Es el caso de las apolipoproteínas o la lp(a).

En cualquier caso, el enfoque de las recomendaciones terapéuticas se debe realizar desde la consideración de que la aterosclerosis es una enfermedad multifactorial con implicación de todos los FRC. Por otra parte, la interacción entre los FRC es muy acusada y el riesgo derivado de la exposición simultánea a varios de ellos es muy superior al que correspondería a la simple suma de dichos factores. Por lo tanto, en la estimación del riesgo cardiovascular de un individuo, debemos valorar conjuntamente varios factores de riesgo para conseguir una mejor aproximación. Además los FRC están íntimamente interrelacionados y muchas actitudes terapéuticas permiten modificar simultáneamente varios de ellos y reducir así el riesgo cardiovascular total.

III. Factores de riesgo cardiovascular lipídicos

1. Lípidos séricos

La hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo modificables de la enfermedad cardiovascular. El estudio Multiple Risk Factor Intervention Trial demostró la existencia de una relación continua y gradual entre la colesterolemia y la mortalidad total y por cardiopatía isquémica⁶², que ha sido recientemente admitida en las guías de la ACC/AHA⁴³.

El colesterol es un lípido presente en las membranas celulares, precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas. Las lipoproteínas plasmáticas están constituidas por lípidos y proteínas y transportan el colesterol y los lípidos esterificados de la sangre. La parte proteica de las lipoproteínas está compuesta por proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. Cada lipoproteína tiene una composición apolipoproteica particular y relativamente constante. Las apolipoproteínas desempeñan un importante papel en el transporte de los lípidos, activando o inhibiendo enzimas implicadas en el metabolismo de éstos o fijando lipoproteínas a los receptores de la superficie celular⁶³.

Lipoproteína	Triglicéridos (%)	Colesterol (%)	Densidad (g/mL)	Tamaño (nm)	Apolipoproteínas
Quilomicrón	90-95	2-5	<0,95	75-1200	B-48, C, E
VLDL	50-65	20	0,95-1,006	30-80	B-100, C, E
IDL	30-35	40	1,006-1,019	15-35	B-100, E
LDL	5-7	45-65	1,019-1,063	18-25	B-100
HDL	7	38	1,063-1,210	7,5-20	A

Tabla 2. Clasificación y características de las lipoproteínas. VLDL: lipoproteínas de densidad muy baja; IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de densidad baja; HDL: lipoproteínas de densidad alta⁶⁴.

Las tres clases principales de lipoproteínas que se encuentran en el suero son las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las LDL, y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Una clase menor son las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), que se encuentran entre las VLDL y las LDL y que en la práctica clínica se incluyen en la medida de las LDL.

En la Tabla 2 se muestran algunas de las características de las lipoproteínas. En general, son ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL e IDL) o ricas en colesterol (IDL, LDL y HDL). El tamaño de la partícula guarda una relación inversa con su densidad (a mayor tamaño, menor densidad).

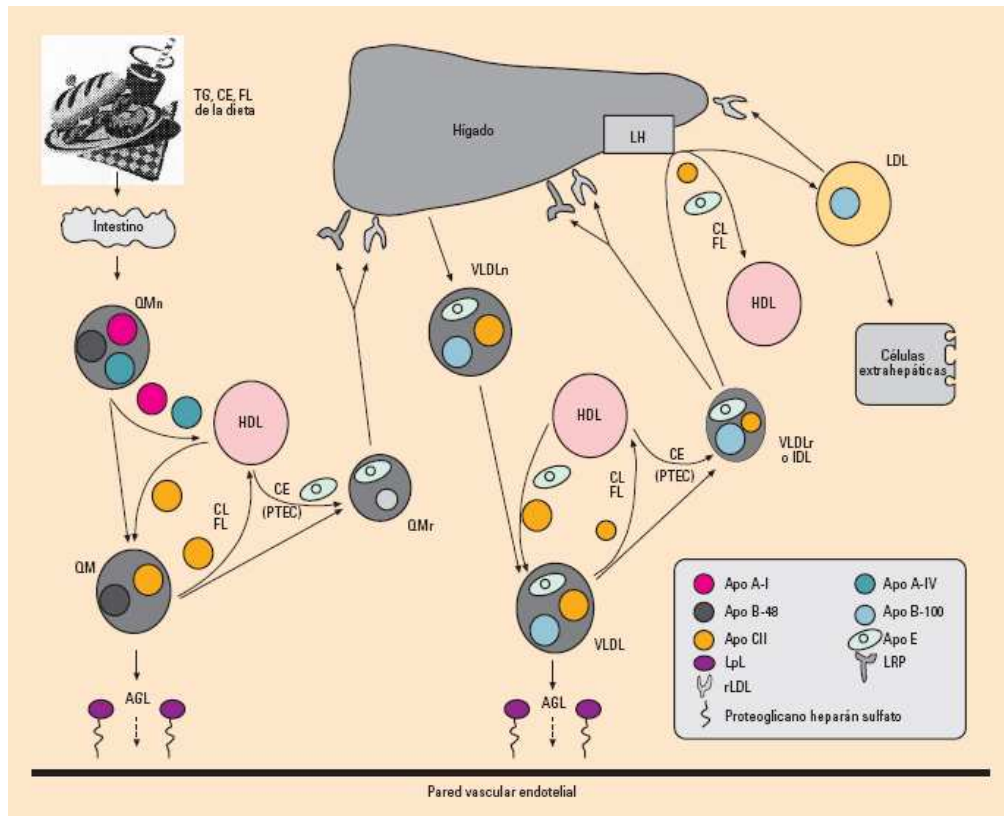


Imagen 3. Metabolismo exógeno y endógeno de las lipoproteínas⁶⁵.

Con excepción de las HDL, que transportan el colesterol de los tejidos periféricos al hígado (transporte reverso) y por lo tanto, ejercen una acción vasoprotectora, las partículas lipídicas son más aterogénicas cuanto más colesterol transportan. Los quilomicrones llevan tan escasa cantidad de colesterol, que su aumento en la hiperquilomicronemia (dislipidemia tipo I), no se asocia a lesiones ateroscleróticas. En cambio, a partir del acúmulo de las VLDL, una quinta parte de las cuales está constituida por colesterol, se empieza a observar un incremento de la aterogénesis. Dado que las LDL son las partículas con mayor cantidad de colesterol, son las lipoproteínas con mayor poder aterogénico.

- En torno al 25% de la masa de las LDL son proteínas, principalmente apoB, con algo apolipoproteína C. El cLDL constituye el 60-70% del colesterol total sérico. Las partículas LDL más “pequeñas y densas” son más aterogénicas que las de mayor tamaño y menor densidad, habiendo sido valoradas como potencial FRC^{41,66}.

Aproximadamente un 60% de las lipoproteínas LDL son captadas por el hígado donde su apoB se une específicamente a un receptor situado en la membrana de las células hepáticas, permitiendo su endocitosis dentro del hepatocito (Imagen 3). El 40% restante son captadas por los tejidos extrahepáticos, que tienen receptores para apoB y pueden internalizar las partículas LDL y utilizar el colesterol para la síntesis de hormonas esteroideas y de las membranas, así como para la síntesis de vitamina D en la piel. Si

existe un exceso de lipoproteínas LDL circulantes los receptores de membrana tanto hepáticos como extrahepáticos, se saturan. El exceso de LDL puede ser oxidado y captado de forma no específica por los macrófagos presentes en el subendotelio arterial. La exposición de las células endoteliales al LDL oxidado induce una respuesta inflamatoria responsable del inicio del complejo mecanismo de la aterosclerosis⁶⁷.

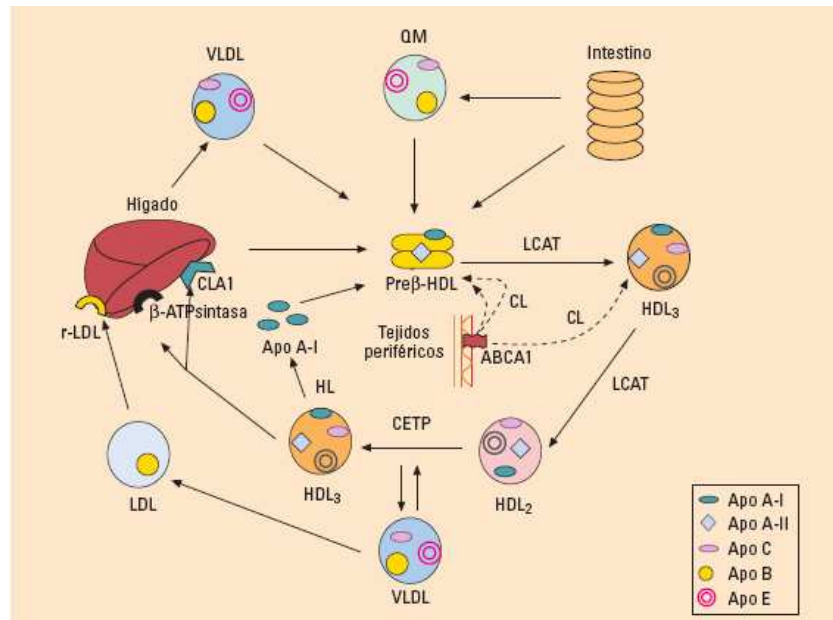


Imagen 4. Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL)⁶⁵.

- El cHDL normalmente representa el 20-30% del colesterol total sérico. Las HDL son partículas pequeñas que constan de un 50% de proteínas, principalmente apolipoproteínas A-I (apoA) y A-II, aunque también algo de apolipoproteínas C y E y su función principal es captar el colesterol de los tejidos periféricos y devolverlo al hígado, lo que se conoce como transporte reverso del colesterol. El colesterol de las membranas celulares y de otras lipoproteínas se transfiere a las HDL y se esterifica por acción de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) en presencia de la apoA. Los esteres de colesterol de las HDL son posteriormente transferidos al hígado por uno de los siguientes mecanismos: transferencia directa a través de receptores hepáticos y transferencia indirecta a otras lipoproteínas que contengan apoB a través de la proteína transferidora de esteres de colesterol (CETP), siendo eliminado después con estas lipoproteínas (Imagen 4).
- Las VLDL son lipoproteínas ricas en triglicéridos que contienen entre el 10 y el 15% del colesterol total. La mayor parte de las apolipoproteínas de las partículas VLDL son apoB, apolipoproteínas C-I, C-II y C-III y apolipoproteína E. La lipoproteína lipasa (LPL) es la enzima que hidroliza los triglicéridos de quilomicrones y VLDL y requiere apoC-II como cofactor. Las VLDL se producen en el hígado y son las precursoras de las IDL. Aunque las LDL reciben la mayor atención en el manejo clínico, existen evidencias que

indican que las VLDL juegan un papel en la aterogenesis^{41,63}. Las partículas VLDL remanentes o lipoproteínas IDL son VLDL parcialmente degradadas que están relativamente enriquecidas en esteres de colesterol^{41,63} y parecen estar implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis de forma similar a las LDL.

- Una cuarta clase de lipoproteínas son los quilomicrones que se forman en el intestino y que son muy ricos en triglicéridos de origen exógeno y pobres en colesterol libre y fosfolípidos. Contienen un 1-2% de proteínas, incluyendo las apolipoproteínas B-48, A-I y A-IV, presentes desde que son secretadas por el enterocito, y las apolipoproteínas C-I, C-II, C-III y E, que son adquiridas por intercambio con otras lipoproteínas en la circulación⁶³.

El riesgo cardiovascular atribuido a la hipercolesterolemia se debe principalmente al incremento del cLDL y se ha demostrado que su descenso mediante fármacos hipolipemiantes reduce de forma significativa la morbimortalidad cardiovascular^{39,41,62}. Por otra parte, los niveles séricos de cHDL se consideran un importante factor antiaterogénico debido principalmente a su función de transporte reverso del colesterol, habiéndose demostrado que su aumento se asocia a un efecto protector sobre el desarrollo de enfermedades cardiovasculares^{39,41,68}.

El panel III de la NCEP incluyó entre los FRC emergentes la determinación del cociente colesterol total/cHDL⁴¹. Esta razón ha demostrado ser un potente predictor de la aparición de futuros episodios de enfermedad cardiovascular^{69,70}. Algunos autores han preferido utilizar la sustitución del colesterol total en el numerador por el cLDL podría dar más fuerza a la relación, ya que tiene en cuenta la partícula lipoproteica aterogénica⁷¹. En cualquier caso, ninguno de estos cocientes se incluyen en el diseño de las estrategias terapéuticas⁴¹.

2. Triglicéridos

Existe una estrecha relación entre la presencia de unos niveles séricos elevados de triglicéridos y la existencia de otros FRC lipídicos (presencia en el plasma de lipoproteínas residuales o remanentes de las VLDL y de los quilomicrones, predominio en el plasma de partículas de LDL “pequeñas y densas”, disminución de la concentración plasmática de cHDL y no lipídicos (hipertensión, intolerancia a la glucosa, estado protrombótico)^{72,73}. A pesar de las evidencias descritas en algunos estudios epidemiológicos de la relación entre la hipertrigliceridemia y la incidencia de enfermedad cardiovascular^{74,75}, los resultados de otros estudios no permiten considerar de forma definitiva a los triglicéridos como FRC independiente⁷³.

El Panel III de la NCEP admite que la elevación de los niveles de triglicéridos (>200 mg/dL) se relaciona con un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular, contemplando la hipertrigliceridemia mas bien como un marcador de la presencia de otros FRC lipídicos y no lipídicos y establece que los objetivos terapéuticos en este sentido se basen en cambios en el estilo de vida

(pérdida de peso, ejercicio, abandono del hábito tabáquico)^{41,76} para conseguir las concentraciones deseables de cLDL. Sin embargo, al igual que ocurre en el caso de las apolipoproteínas, las recomendaciones de la ACC/AHA expresan incertidumbre sobre su utilización en la toma de decisiones y considera que precisa de estudios complementarios⁴⁴.

3. Apolipoproteínas

Las apolipoproteínas A son un grupo de proteínas distribuidas en forma variable entre las diferentes lipoproteínas. La apolipoproteína A-I (apoA) es la más abundante del plasma y está presente en las lipoproteínas HDL, donde constituye cerca del 90% y el 60-70% de la fracción proteica en las subfracciones HDL2 y HDL3, respectivamente. Es sintetizada inicialmente en el hígado e intestino como un precursor proteico, el cual es degradado hasta su forma madura en el plasma, que es una simple cadena polipeptídica de 243 aminoácidos. Como componente proteico de mayor concentración de las HDL, participa activamente en el transporte reverso de colesterol actuando como cofactor de la LCAT que es la enzima plasmática responsable de esterificar el colesterol libre en la superficie de la partícula HDL. La apolipoproteína A-II es el segundo componente proteico de mayor concentración de las HDL, aunque está ausente en la subfracción HDL2 y los niveles plasmáticos no correlacionan con los niveles de cHDL, siendo el ratio de apolipoproteína A-I/A-II en las HDL de 3:1.

Las apolipoproteínas B son proteínas de gran peso molecular, presentes en los quilomicrones, lipoproteínas VLDL y LDL y por tanto sus niveles son un reflejo de las partículas proaterogénicas. Existen dos formas moleculares en plasma, apolipoproteína B-100 (apoB) y apolipoproteína B-48, esta última presente exclusivamente en los quilomicrones.

La apoB, constituida por una cadena polipeptídica de 4.536 aminoácidos, se sintetiza en el hígado y se secreta dentro de las VLDL. Se mantiene durante la conversión de VLDL a IDL hasta LDL, de la cual es el único componente proteico y por esta razón, los niveles de apoB están correlacionados con los niveles de estas lipoproteínas. Existen diversos estudios que establecen la relación entre las concentraciones en suero de apoB y el riesgo cardiovascular^{77,78,79}.

Dado que cada partícula de VLDL, IDL y LDL sólo contiene una molécula de apoB, la concentración en suero es un reflejo del número de partículas LDL y del riesgo asociado con estas partículas aterogénicas. La NCEP^{40,41,42} la consideró un factor de riesgo, aunque no recomienda su determinación en la práctica clínica, al no disponer de guías ni algoritmos de estratificación de riesgo basados en su concentración y las últimas recomendaciones de la ACC/AHA interpretan que no pueden incorporarse aún en las recomendaciones hasta que se demuestre su eficacia^{43,44,45}.

La determinación de apolipoproteínas presenta ventajas metodológicas con respecto a la determinación de cLDL. En el laboratorio clínico, la concentración del cLDL sérico a menudo se calcula a partir de otras magnitudes lipídicas, generalmente utilizando la fórmula de Friedewald, que está sujeta a posibles errores inherentes. El cálculo es especialmente problemático en el rango de

valores de cLDL más bajos, no está estandarizado y no puede calcularse si la concentración de triglicéridos es mayor de 400 mg/dL. Por el contrario, la apoA y la apoB pueden medirse directamente, no requieren ayuno previo a la extracción de las muestras de sangre y el análisis puede llevarse a cabo en muestras congeladas, además de estar estandarizada internacionalmente⁸⁰. Los resultados de diversos estudios han demostrado que la relación de apoB/apoA es superior a la relación colesterol total/cHDL, o a la de cLDL/cHDL como índice general de riesgo de enfermedad cardiovascular^{81,82}.

4. Lipoproteína (a)

Durante los últimos años, la lp(a) ha atraído un enorme interés como factor de riesgo cardiovascular^{83,84}. La lp(a) es una lipoproteína esférica, rica en ésteres de colesterol y fosfolípidos, que se asemeja en su composición a la LDL. Contiene una glicoproteína específica, la apolipoproteína (a), unida por un puente disulfuro a la apoB (Imagen 5) y posee una gran homología estructural con el proenzima fibrinolítico plasminógeno⁸⁵.

La apolipoproteína (a) está codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 6, existiendo un elevado polimorfismo genético. Los componentes de la lp(a) se sintetizan mayoritariamente en las células hepáticas y posteriormente se ensamblan pudiendo madurar la lp(a) tanto fuera como dentro del hepatocito⁸⁵. Su concentración es independiente de las de las otras lipoproteínas salvo en la hipercolesterolemia familiar, donde cifras aumentadas parecen relacionarse con el aumento de las LDL⁸⁶. El 90% de la concentración de esta lipoproteína viene determinado de forma genética y solo el 10% es modificable y dependiente de factores ambientales como el ejercicio físico, el consumo de ácidos grasos y de alcohol⁸⁷. Las concentraciones séricas pueden variar entre 0-200 mg/dL aunque se consideran normales por debajo de 30 mg/dL⁸⁸. Puede comportarse como un reactante de fase aguda, por lo que no debe evaluarse en situaciones agudas. Su concentración es baja en el momento del nacimiento y aumenta a los pocos días para permanecer prácticamente sin cambios, tanto en varones como en mujeres, aunque en mujeres se eleva durante la gestación y tras la menopausia⁸⁸.

Han sido descritos algunos mecanismos que pueden explicar la relación entre la lp(a) y la enfermedad cardiovascular. En primer lugar, al ser una partícula LDL, la lp(a) desempeña un papel en la iniciación, progresión y posible rotura de la placa de ateroma. En segundo lugar, esta partícula compete con el plasminógeno e inhibe la actividad trombolítica⁸⁹. Por otra parte, se ha demostrado, mediante estudios realizados en líneas celulares de ratones, que la lp(a) inhibe la síntesis de NO⁹⁰.

Aunque el aumento de la concentración plasmática de lp(a) implica un aumento del riesgo cardiovascular, principalmente en los individuos con riesgo global aumentado^{41,91,92}, actualmente los principales documentos de consenso, como la guía ACC/AHA⁴⁴, no la incluyen entre los factores de riesgo cardiovascular computables para la evaluación del riesgo global. Esto es debido a que algunos

estudios no corroboran una predicción independiente por parte de los niveles de lp(a) de padecer un episodio de enfermedad cardiovascular^{93,94} y a que no hay evidencias de que su cribado produzca un beneficio en prevención para los pacientes^{44,95}. Las últimas recomendaciones de la SEQC (Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular) publicadas en 2013⁹⁶ apoyan el no realizar la medición de la concentración de lp(a) como método de cribado para el cálculo del riesgo cardiovascular en la población general, pero si medir sus concentraciones en los individuos con riesgo intermedio o elevado de enfermedad cardiovascular según los FRC tradicionales.

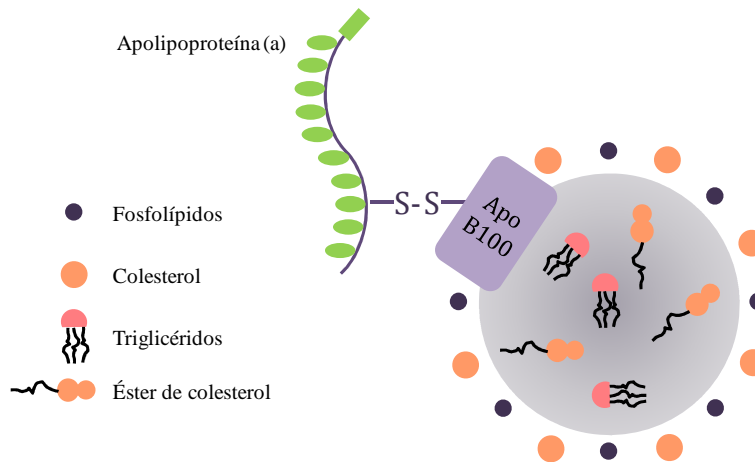


Imagen 5. Estructura de la lipoproteína (a).

IV. Marcadores de inflamación: proteína C reactiva

El estado inflamatorio vascular caracteriza todas las fases del proceso aterotrombótico. Numerosos estudios han caracterizado diversos elementos que intervienen en el proceso inflamatorio, como las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, selectinas E y P y algunas citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que se han revelado como predictores del riesgo de presentar un episodio de enfermedad cardiovascular⁹⁷.

Tanto las dificultades para la determinación de estos marcadores como la corta vida media de estas moléculas en la circulación hacen que no sea posible su introducción en la práctica clínica. De estos y otros marcadores de inflamación que se han propuesto como el amiloide sérico A, el recuento leucocitario, el fibrinógeno, la nitrotirosina, la mieloperoxidasa y la PCR, sólo esta última se ha afianzado como candidata por su estabilidad, precisión del análisis y asequibilidad⁹⁸.

La PCR es un miembro de la familia de las proteínas pentraxínicas, caracterizada por tener una estructura pentamérica cíclica y una simetría radial, formada por cinco protómeros de 24 kD y 206 aminoácidos, unidos entre sí mediante enlaces no covalentes. Tiene capacidad de unirse a una gran variedad de sustancias, como fosfocolina, fibronectina, cromatina, histonas y ribonucleoproteínas⁹⁹.

La diferenciación de los monocitos a macrófagos que tiene lugar durante el proceso aterosclerótico libera moléculas proinflamatorias, entre las que se encuentra la interleucina IL-6, que activa la liberación en el hígado de marcadores de inflamación como la PCR. En las infecciones bacterianas se observan niveles elevados (>10 mg/L), pero mediante el análisis ultrasensible (PCRus) puede detectarse inflamación a niveles muy inferiores (0-3 mg/L), que son los que asocian al proceso aterosclerótico.

La PCR es el biomarcador inflamatorio mejor caracterizado en la actualidad y ha sido establecido como potencial marcador de riesgo cardiovascular. La PCR se considera un predictor independiente de enfermedad coronaria para la población general de ambos sexos y también para los pacientes que han presentado ya manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular^{97,98}. La ACC/AHA⁴⁴ consideran que de todos los marcadores inflamatorios, sólo la PCR reúne las características necesarias para ser utilizada en la práctica clínica¹⁰⁰ y establece que en individuos seleccionados, una PCR >2 mg/L, puede indicar la decisión de administrar estatinas, al igual que otros factores seleccionados como la historia de enfermedad aterosclerótica cardiovascular prematura en familiares de primer grado o la presencia de calcificaciones coronarias.

V. Homocisteína

En los últimos años se han publicado numerosos estudios que relacionan la hiperhomocisteinemia con un riesgo aumentado de enfermedad coronaria, vascular cerebral y periférica^{101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112}.

La homocisteína es un aminoácido sulfurado, producto intermediario en el metabolismo de la metionina. Contiene un grupo sulfhidrilo en su molécula que la hace altamente oxidable a pH fisiológico, formándose disulfuros, como la homocistina o la cisteinil-homocisteína. También puede unirse a proteínas y en el plasma lo hace principalmente con la albúmina¹¹³.

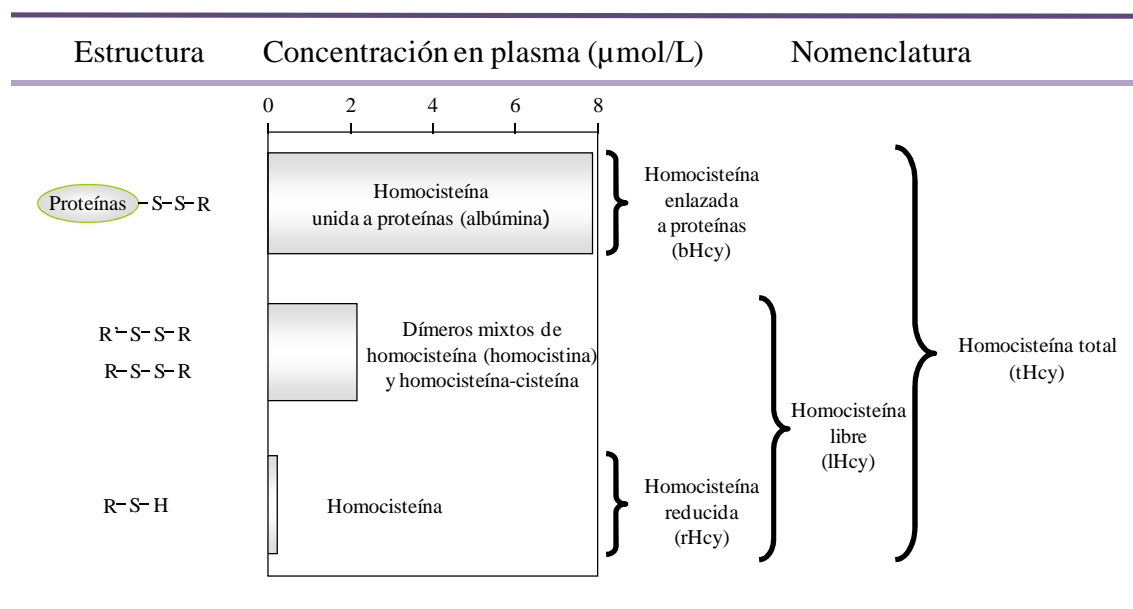


Imagen 6. Homocisteína: formas mayoritarias en plasma humano (adaptada de Mudd *et al.*¹¹³).

En una persona con niveles de homocisteína total (tHcy) normales (5-12 $\mu\text{mol/L}$) o ligeramente elevados (>12-25 $\mu\text{mol/L}$), más de un 98% de la tHcy circulante está oxidada en forma de disulfuros. Se encuentra en forma de dímero, homocistina (5-10%), de dímeros mixtos de homocisteína y otros tioles (5-10%) y más de un 80% se encuentra en forma de dímero unido a proteínas (Imagen 6)¹¹³. En una hiperhomocisteinemia severa, en la que los niveles de tHcy se encuentran entre 50 y 500 $\mu\text{mol/L}$, es donde se observa que los niveles de homocisteína libre (lHcy) y reducida (rHcy) ocupan una parte sustancial¹¹⁰.

Las concentraciones elevadas de homocisteína han sido asociadas con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular aterotrombótica desde la descripción de estos desórdenes en niños y pacientes muy jóvenes con una enfermedad metabólica conocida como homocistinuria^{114,123}. En 1969, McCully¹¹⁵ realizó la primera observación acerca de una posible relación entre la enfermedad aterotrombótica y la concentración de homocisteína, tras observar una aterosclerosis severa en un niño

con homocistinuria debida a un defecto de cistationina-β-sintasa (CβS). Esta enfermedad de origen genético, poco frecuente, se caracteriza por una hiperhomocisteinemia plasmática grave y una marcada excreción de homocistina. Se origina por mutaciones en los genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la homocisteína, como la CβS o la metil tetrahidrofolato reductasa (Imagen 7)^{116,117}.

Existen otras situaciones que producen hiperhomocisteinemias adquiridas, de origen no genético. Las deficiencias nutricionales de ácido fólico, vitaminas B₁₂, B₆ o riboflavina son la causa más frecuente de hiperhomocisteinemia moderada, así como algunas enfermedades relacionadas con malnutrición o con una demanda vitamínica aumentada, como las enfermedades gastrointestinales, la anorexia nerviosa, el virus de la inmunodeficiencia humana, la insuficiencia renal o el hipotiroidismo¹¹⁴. También diversos fármacos pueden elevar las concentraciones de homocisteína, entre los que se encuentran aquellos que interaccionan con la absorción o el metabolismo del folato, o las vitaminas B₆ y B₁₂, como el metotrexato y algunos antiepilépticos con acción antifolato¹¹⁸.

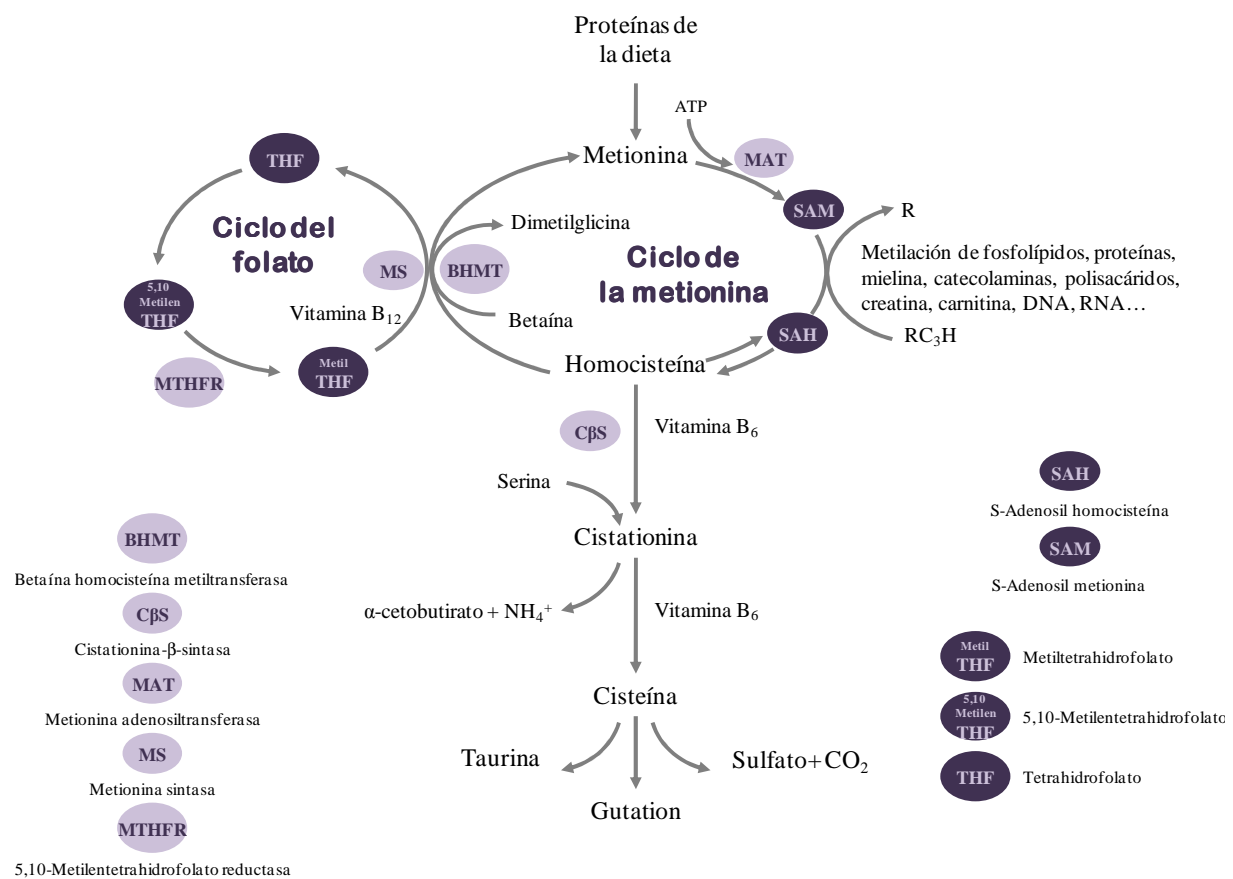
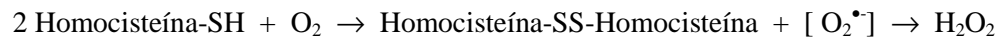


Imagen 7. Metabolismo de la homocisteína.

Se han planteado varias hipótesis acerca del mecanismo por el cual la homocisteína circulante está relacionada con la enfermedad cardiovascular. Una de las posibles causas de la aterogénesis es la alteración directa o indirecta que produciría la homocisteína en el equilibrio oxidativo y que dañaría el endotelio^{119,120,121,122}. La homocisteína en el plasma se oxida formando especies reactivas de oxígeno

(ROS), entre las que se incluyen el peróxido de hidrógeno y radicales libres, como el hidroxilo y el anión superóxido^{110,122}, que son muy reactivas y producen lesión endotelial¹¹⁹.



El endotelio dañado a su vez hace que quede expuesta la matriz subendotelial, con lo que se estimula la agregación plaquetaria. Los radicales libres que se producen pueden promover además la oxidación de las LDL, las cuales tienen un efecto citotóxico sobre la pared vascular y son fácilmente reconocidas y captadas por los macrófagos del endotelio. La observación de que los antioxidantes son efectivos en el bloqueo de este daño apoya la implicación del incremento del estrés oxidativo en esta alteración^{123,124}. La rHcy sería la forma química más reactiva y la principal responsable de estos efectos, por lo que debería ser considerado como un marcador más sensible y significativo¹²⁵.

Entre otros posibles mecanismos aterogénicos que se han descrito tratando de explicar la relación existente entre la homocisteína y el riesgo cardiovascular se encuentran: la disminución de la biodisponibilidad de NO^{126,127}, bien por una disminución en la síntesis o por reacción con la homocisteína para formar S-nitroso-homocisteína, la proliferación de las células musculares lisas de la pared arterial¹²⁸, la alteración de la síntesis de colágeno y el depósito de la matriz glicoproteica extracelular en la pared de los vasos y la destrucción de fibras elásticas de la pared vascular¹²⁹.

VI. Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica

1. Óxido nítrico

El NO posee potentes propiedades antiateroscleróticas (Imagen 8). El NO derivado del endotelio tiene capacidad para producir vasodilatación y regular la presión arterial, inhibe la agregación plaquetaria¹³⁰, inhibe la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales y la expresión de moléculas de adhesión^{131,132}. Además, posee propiedades antioxidantes derivadas de su capacidad de reducir la generación del radical superóxido y de disminuir la oxidación de las partículas LDL¹³³.

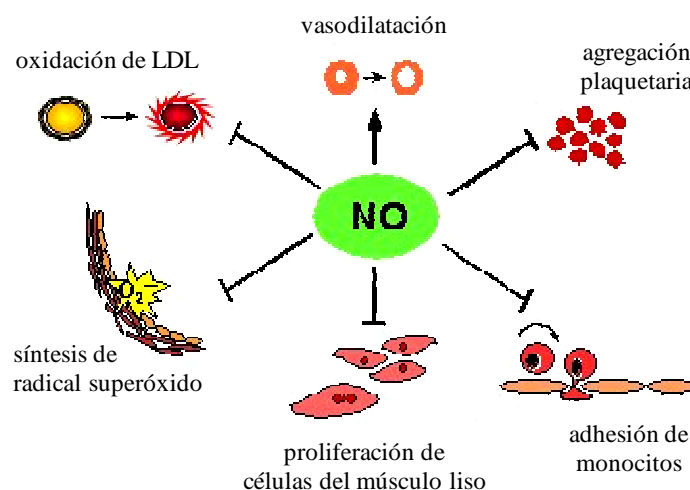


Imagen 8. Efectos del óxido nítrico en el sistema cardiovascular¹³³.

En 1980 Furchgott *et al.*¹³⁴, demostraron que la presencia de las células del endotelio vascular es esencial para que la acetilcolina pueda inducir la relajación. Si el endotelio vascular se retira, en los vasos sanguíneos falla la relajación en respuesta a la acetilcolina pero se mantiene la respuesta al trinitrato de glicerol. Esta relajación de las células del músculo liso de la pared vascular dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina, se lleva a cabo por un mediador endógeno que inicialmente llamaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y que más tarde fue identificado como NO^{135,136}.

La producción de NO es uno de los principales mecanismos implicados en la fisiología del endotelio. Es un gas que difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células de músculo liso de la pared vascular, donde activa la guanilato ciclasa, una enzima que cataliza la formación de guanosin-3',5-monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosin trifosfato (GTP), desencadenándose la vasodilatación arterial. El GMPc, es un mediador en muchos de los efectos biológicos del NO, incluyendo el control del tono vascular y la función plaquetaria¹³⁷.

Existe una síntesis continua de NO en el endotelio vascular para mantener el tono vascular en reposo y de esta forma, regular el flujo sanguíneo en respuesta a estímulos tales como las fuerzas de cizallamiento, conocido como dilatación arterial mediada por el flujo^{138,139,140}, y la activación de receptores en el endotelio vascular por moléculas circulantes como la bradikina o la acetilcolina¹³⁷.

El NO derivado del endotelio es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina por la isoforma endotelial de la NOS, dando L-citrulina como subproducto (Imagen 9). Para la biosíntesis del NO se requieren cofactores como la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), falvin mononucleotido (FMN), falvin adenina dinucleotido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) y calmodulina¹³².

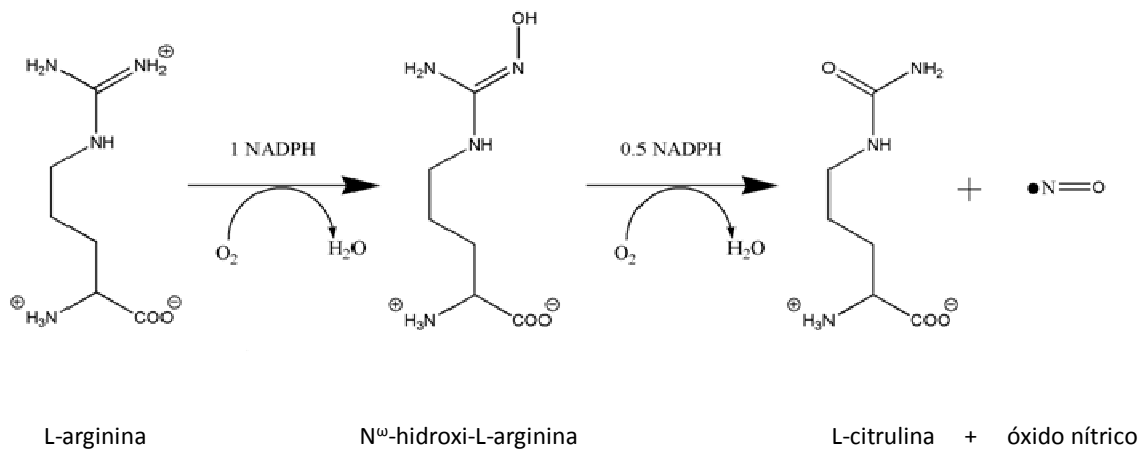


Imagen 9. Síntesis del óxido nítrico catalizada por la óxido nítrico sintasa¹⁴¹.

Se han descrito tres isoformas de la NOS: la isoforma endotelial (eNOS), la isoforma neuronal (nNOS) y la isoforma inducible (iNOS) y desempeñan papeles distintos en la regulación del tono vascular. Los genes que codifican las NOS están localizados en los cromosomas 7, 12 y 17, respectivamente. La eNOS y la nNOS son constituyentes normales en las células sanas, mientras que la iNOS no se encuentra generalmente expresada en las células vasculares y se expresa principalmente en situaciones infecciosas o inflamatorias¹⁴².

La disfunción endotelial puede ser debida a un incremento en la vasoconstricción o a una reducción de la vasodilatación. De entre las posibles causas de esta última, las alteraciones en la vía de la eNOS, han sido las más estudiadas. Los desórdenes en esta vía pueden deberse a reducciones en la vida media o en la sensibilidad al NO, o reducciones en la expresión o en la actividad de la eNOS¹⁴³.

El NO es lábil y tiene una vida media muy corta (menos de 4 segundos). Se oxida rápidamente a nitrito y, posteriormente, a nitrato por acción de la oxihemoglobina¹³⁷ antes de ser excretado por la orina. Si la disponibilidad de L-arginina (precursor) o de la tetrahidrobiopterina (cofactor) disminuye, la eNOS produce la síntesis alternativa de radical superóxido (O₂[•]) a partir del oxígeno¹⁴³.

La concentración endotelial de NO no sólo se reduce debido a la disminución de su síntesis. El tiempo de vida medio del NO y por lo tanto, su actividad biológica está determinado por radicales

libres de oxígeno como el superóxido y se reduce en condiciones de estrés oxidativo. El superóxido reacciona rápidamente con el NO para formar un producto intermedio altamente reactivo, el peroxinitrito¹⁴⁴. Esta reacción es 3-4 veces más rápida que la dismutación del superóxido por la superóxido dismutasa. Por lo tanto, la formación del peroxinitrito representa una posible vía de reacción para el NO, dependiente de la tasa de producción tisular de superóxido¹⁴⁵. El peroxinitrito en altas concentraciones es citotóxico y puede causar daño a biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA¹⁴⁶.

Por otra parte, en estados avanzados de la aterosclerosis, se observa una reducción de la expresión de la eNOS, posiblemente debido a la inestabilidad inducida por las citocinas o los lípidos o a la reducción de la transcripción del mRNA de la eNOS¹⁴³. Además, algunos polimorfismos encontrados en el gen que codifica la eNOS podrían estar asociados con alteraciones funcionales en el enzima y con la enfermedad vascular¹⁴⁷.

Finalmente, la actividad de la eNOS puede ser inhibida por algunos derivados de la L-arginina en los que el átomo de hidrogeno del grupo guanidino está sustituido por un grupo metilo, nitro u otros grupo químicos. El primer análogo de la L-arginina sintetizado fue el N^G-monometil-L-arginina (NMMA) y posteriormente el éster metílico de la N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Estos y otros derivados han sido utilizados en estudios experimentales en animales como herramientas terapéuticas para reducir la disponibilidad de NO e inducir hipertensión experimental^{148,149}. Sin embargo, algunos de los derivados metilados se han localizado como metabolitos endógenos que actúan modificando la síntesis de NO.

2. Dimetilarginina asimétrica

El ADMA es un inhibidor competitivo endógeno de la NOS, descubierto en 1992 en enfermos con insuficiencia renal por Vallance *et al.*¹⁵⁰, quienes identificaron por primera vez análogos de la L-arginina en plasma y orina humanos (Imagen 10). Los análogos identificados fueron el NMMA y la N^G,N^G-dimetil-L-arginina (ADMA), compiten directamente con el sustrato natural L-arginina y pueden regular la biosíntesis de NO. Otro análogo endógeno de la L-arginina que caracterizaron fue la N^G,N^G-dimetil-L-arginina simétrica (SDMA), sin embargo esta no presenta la capacidad de inhibir la eNOS. El NMMA y el ADMA son inhibidores equipotentes de la eNOS, pero el hecho de que los niveles plasmáticos del ADMA sean 10 veces superiores a los del NMMA hacen de aquel, el principal inhibidor endógeno de la eNOS.

Debido al efecto inhibitorio que el ADMA ejerce sobre la eNOS, unas concentraciones elevadas de esta molécula bloquearían la formación de NO en el endotelio vascular, provocando alteraciones como la disminución de la vasodilatación, la agregación plaquetaria, la proliferación celular, la oxidación de las LDL, la aparición de radicales libres y otros factores que contribuyen a la formación y progresión del proceso aterosclerótico.

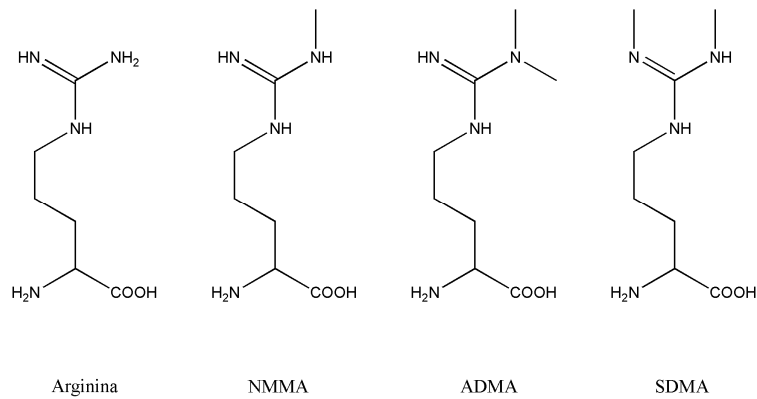


Imagen 10. Estructuras químicas de la L-arginina y de las metilargininas endógenas. NMMA: monometil arginina, ADMA: dimetilarginina asimétrica, SDMA: dimetilarginina simétrica.

Las dimetilargininas se forman como producto de la proteólisis de las proteínas con residuos de arginina metilados (Imagen 11). La metilación proteica es un mecanismo ubicuo de modificación post-transduccional de las proteínas, en el que la adición de un grupo metilo a la cadena polipeptídica de la proteína da lugar a la modificación de la estructura terciaria y la función de la proteína. Este proceso está catalizado por un grupo de enzimas denominadas metiltransferasas que utilizan la S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo y que catalizan un gran número de metilaciones que pueden dividirse en dos grupos: reacciones que modifican grupos carboxilo para generar metilésteres y reacciones de transferencia de grupos metilo a átomos de azufre y nitrógeno de varios aminoácidos¹⁵¹. La función de estas modificaciones no está totalmente clara pero posiblemente proporciona una vía de obtención de proteínas con nuevas funciones sin necesidad de sintetizar proteínas de novo. La metilación del átomo de nitrógeno de la L-arginina pertenece a este grupo de transformaciones y es catalizada por un grupo de enzimas denominadas proteína-arginina metiltransferasas (PRMTs)¹⁵¹.

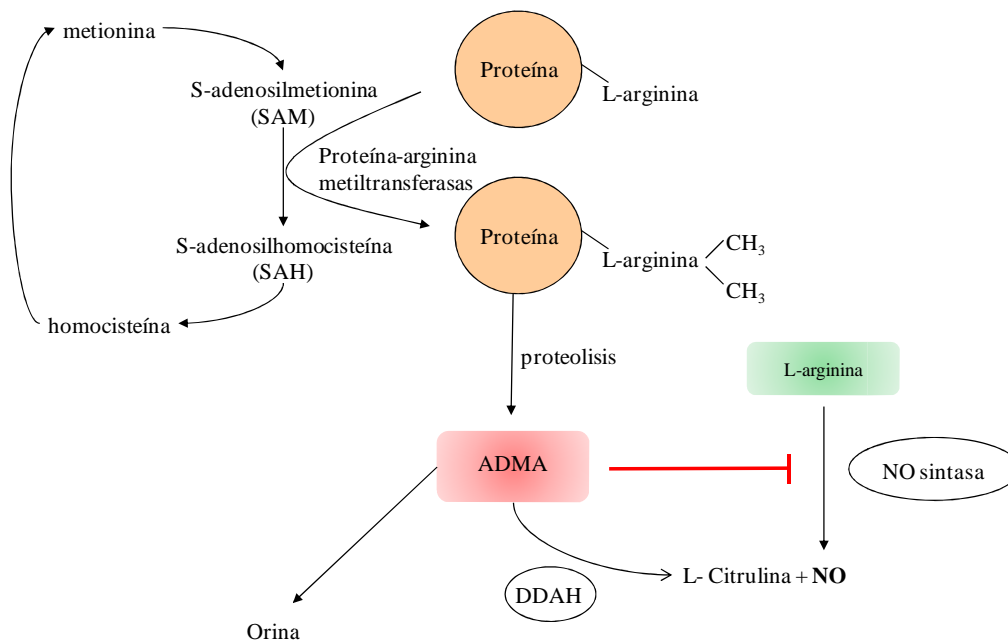


Imagen 11. Biosíntesis y metabolismo del ADMA¹⁵². ADMA: dimetilarginina asimétrica, DDAH: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa, NO: óxido nítrico.

Han sido identificadas 11 PRMTs^{153,154}, de las cuales aún no se ha demostrado actividad para la PRMT2, PRMT10 y PRMT11. El resto de las PRMTs se clasifican en dos grupos según el sustrato y el producto específico de la reacción que catalizan (Tabla 3). Tanto las PRMTs del tipo I como el II producen NMMA como producto intermedio, sin embargo difieren en que las enzimas tipo 1 producen ADMA mientras las enzimas tipo 2 producen SDMA. Los sustratos in vivo para las enzimas tipo 1 incluyen histonas y proteínas de unión a RNA, como ribonucleoproteína heterogénea nuclear (hnRNP) A1, fibrilarina o nucleolina. Son proteínas muy abundantes que contienen grupos o racimos de residuos de argininas asimétricamente metiladas. Aproximadamente, el 65% del ADMA se deriva de las hnRNPs¹⁵⁵.

	Tipo 1	Tipo 2
Genes	PRMT1, PRMT3, PRMT4/CARM1, PRMT6 y PRMT8	PRMT5, PRMT7 y PRMT9/FBXO11
Productos	NMMA y ADMA	NMMA y SDMA

Tabla 3. Clasificación de las proteína-arginina metiltransferasas (PRMTs)¹⁵⁴. NMMA: monometil arginina, ADMA: dimetilarginina asimétrica, SDMA: dimetilarginina simétrica.

Después de la hidrólisis de las proteínas, el ADMA se libera fuera de células y puede ser transportado, exportado o importado, por medio de transportadores de aminoácidos catiónicos (CAT), intercambiándose con L-arginina y otros aminoácidos catiónicos¹⁵⁶ (Imagen 12).

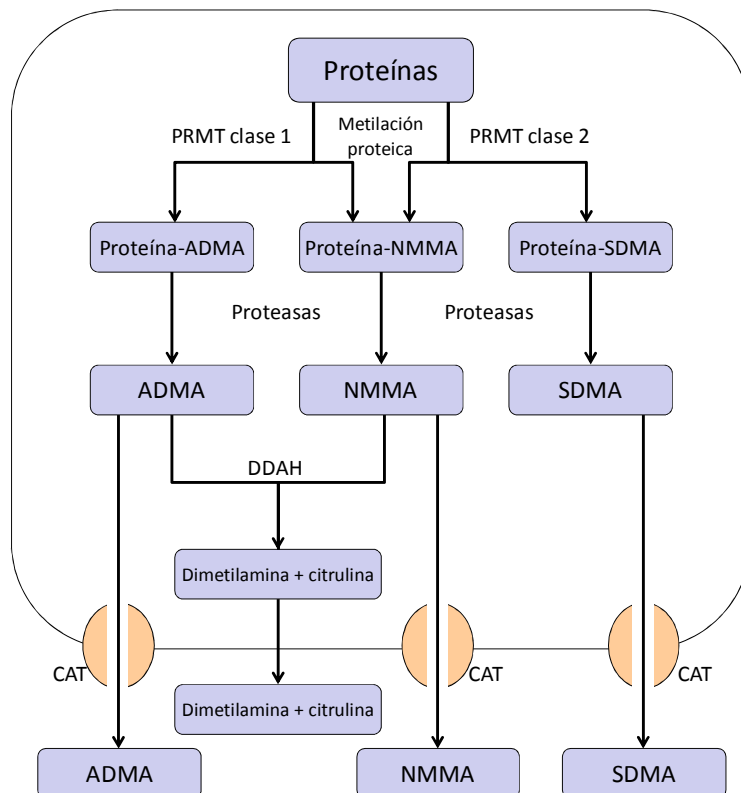


Imagen 12. Esquema representativo del metabolismo del ADMA. PRMTs: proteína-arginina metiltransferasas; CAT: transportadores de aminoácidos catiónicos; DDAH; dimetilarginina dimetilaminohidrolasa; ADMA; dimetilarginina asimétrica; SDMA; dimetilarginina simétrica; NMMA; monometil arginina.

El SDMA se elimina del organismo principalmente por excreción urinaria. Sin embargo, la vía principal de eliminación del ADMA es mediante un enzima denominado dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH) que hidroliza el ADMA a L-citrulina y dimetilamina y solo una pequeña cantidad es eliminada por excreción renal¹⁵⁷. Esto explica la observación de que en enfermos renales los niveles de SDMA se ven incrementados en mayor medida que los de ADMA¹⁵². El ratio ADMA/SDMA ha sido utilizado por algunos autores como un índice aproximado de la actividad de DDAH^{158,159}, donde una disminución del ratio indicaría un aumento de la actividad del enzima.

Las concentraciones plasmáticas elevadas de ADMA se han relacionado con la disfunción endotelial^{160,161,162}, asociada a una reducida producción de NO y una insuficiente vasodilatación dependiente del endotelio^{162,163,164}. También se relacionan con una mayor incidencia de accidentes cardiovasculares^{165,166,167}, lo que ha acrecentado el interés en el estudio del ADMA como marcador de riesgo cardiovascular¹⁶⁸.

En 2001, Valkonen *et al*¹⁶⁵ demostraron que los sujetos con niveles de ADMA superiores a 0,62 $\mu\text{mol/L}$ (percentil 75), tenían 4 veces más riesgo de padecer un evento coronario agudo. Esta observación ha sido corroborada por otros autores en pacientes con angina inestable, en los que se observó que aquellos con los niveles más elevados de ADMA tenían un riesgo 5 veces más elevado de padecer un evento cardiovascular agudo¹⁶⁹.

En general los estudios publicados en la última década evidencian que el ADMA es un FRC tanto en pacientes de riesgo como en la población general, aunque en este último grupo la información al respecto es más escasa. Como parte del estudio LURIC (Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health)¹⁷⁰ se evaluó a un total de 2543 participantes, con y sin enfermedad coronaria arterial identificada mediante angiografía. La concentración de ADMA resultó predecir la mortalidad cardiovascular en individuos con arteriopatía coronaria de forma independiente al resto de los factores de riesgo cardiovascular evaluados, tanto tradicionales como emergentes.

Zoccali *et al.*¹⁶⁶ demostraron en pacientes en hemodiálisis, que los niveles plasmáticos de ADMA son un predictor independiente de mortalidad y riesgo cardiovascular. Los pacientes cuya concentración de ADMA en plasma estuvo por encima del percentil 75, tenían un riesgo 3 veces más elevado de experimentar un episodio cardiovascular adverso comparado con los pacientes cuyos valores de ADMA estaban por debajo de la mediana. Se han encontrado concentraciones elevadas de ADMA en otras situaciones clínicas asociadas con un aumento del riesgo cardiovascular como la hipertrigliceridemia^{171,172}, la diabetes mellitus^{173,174}, la hipertensión¹⁷⁵, la edad¹⁷³, la hipercolesterolemia^{162,175,176}.

En animales de experimentación, se ha observado que el ADMA comienza a aumentar rápidamente después de la inducción de hipercolesterolemia por la dieta, antes incluso de que se observen lesiones ateroscleróticas. En personas clínicamente sanas con hipercolesterolemia aislada y otros FRC se ha encontrado concentraciones plasmáticas elevadas de ADMA, observándose un mayor grado de correlación de la disfunción endotelial con los niveles de ADMA que con los niveles de

cLDL^{160,162}. Además de estos estudios, el hecho de que en todos estos pacientes la administración de L-arginina restablezca la función endotelial^{162,177} sugiere que el ADMA podría ser un marcador temprano de la disfunción endotelial. Dado que el ADMA compite con la L-arginina como sustrato por la eNOS, algunos autores han descrito que la vasodilatación dependiente del endotelio podría ser dependiente del ratio arginina/ADMA¹⁶². Recientemente Notsu *et al.*¹⁷⁸ han descrito que el desequilibrio entre la L-arginina y el ADMA estaría involucrado en la progresión de la aterosclerosis y que el ratio arginina/ADMA puede ser un marcador sensible de aterosclerosis.

Algunos autores también relacionan un incremento en los niveles de homocisteína con la acumulación de ADMA¹⁶⁰. Aunque no están claras las causas de esta relación, existen algunas evidencias de que los niveles elevados de homocisteína podrían disminuir la actividad de la DDAH produciendo una acumulación de ADMA, con la consecuente reducción de la disponibilidad del NO¹⁷⁹.

VII. El ejercicio físico

Para comprender los mecanismos por los cuales el ejercicio físico produce numerosos efectos metabólicos es necesaria una breve revisión de la fisiología del esfuerzo.

La actividad física, el ejercicio y el deporte no son términos intercambiables aunque con frecuencia se utilizan indistintamente. Actividad física es cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que tiene como resultado un gasto de energía¹⁸⁰. Ejercicio físico es un concepto diferente, ya que es un tipo de actividad física realizada por el organismo libre y voluntariamente, que es planificada, estructurada y repetitiva, con un mayor o menor consumo de energía y que tiene como finalidad el mantenimiento o la mejora de uno o más componentes de la forma física^{181,182}. Por aptitud o forma física se entiende la capacidad de desempeñar una actividad física de intensidad ligera-moderada sin fatiga excesiva. El concepto de aptitud física incluye diferentes variables de aptitud cardiovascular, respiratoria, de composición corporal, fortaleza, elasticidad muscular y flexibilidad^{180,181}.

El deporte comprende el juego organizado que lleva consigo la realización de esfuerzo físico que se atiene a una estructura establecida y está organizado dentro de un contexto de reglas formales y explícitas respecto a conductas y procedimientos. El deporte es una actividad física e intelectual que tiene un componente competitivo y de espectáculo e implica un entrenamiento físico¹⁸³. El deporte engloba dos tipos diferentes de actividad física: los entrenamientos para conseguir un mejor acondicionamiento físico y la competición¹⁸⁰.

1. Bases metabólicas

El trabajo muscular es un proceso que requiere energía y el ATP es la fuente inmediata de energía para la contracción muscular (Imagen 13). Dependiendo del tipo de esfuerzo efectuado por el músculo durante la actividad física, el organismo dispondrá de tres vías o sistemas de reacciones químicas para obtener la energía necesaria para formar ATP^{18,180}:

- *Vía anaeróbica aláctica* (sistema fosfágeno o vía de la fosfocreatina): no requiere presencia de oxígeno y no produce ácido láctico como componente final.
Es la vía involucrada en la obtención de energía para el comienzo de un esfuerzo y para mantener éste a su máxima intensidad durante aproximadamente 5-20 segundos.
- *Vía anaeróbica láctica* (glucólisis anaeróbica): no requiere presencia de oxígeno pero produce ácido láctico como componente final.

Es la vía por la que el organismo obtiene la energía necesaria para realizar esfuerzos de intensidad elevada que duran entre 30 segundos y 2 minutos.

- *Vía aeróbica* (glucólisis aeróbica o fosforilación oxidativa): requiere la presencia de oxígeno. Es el sistema encargado de aportar energía al organismo mediante el desdoblamiento del glucógeno/glucosa, para mantener esfuerzos intensos entre 3 y 30 minutos. Cuando el esfuerzo dura más de 30 minutos y, por tanto, la intensidad es menor, el organismo utiliza también este sistema pero en lugar de glucógeno/glucosa utiliza ácidos grasos como combustible. En determinadas circunstancias el organismo puede utilizar también proteínas y sus aminoácidos para obtener esta misma energía.

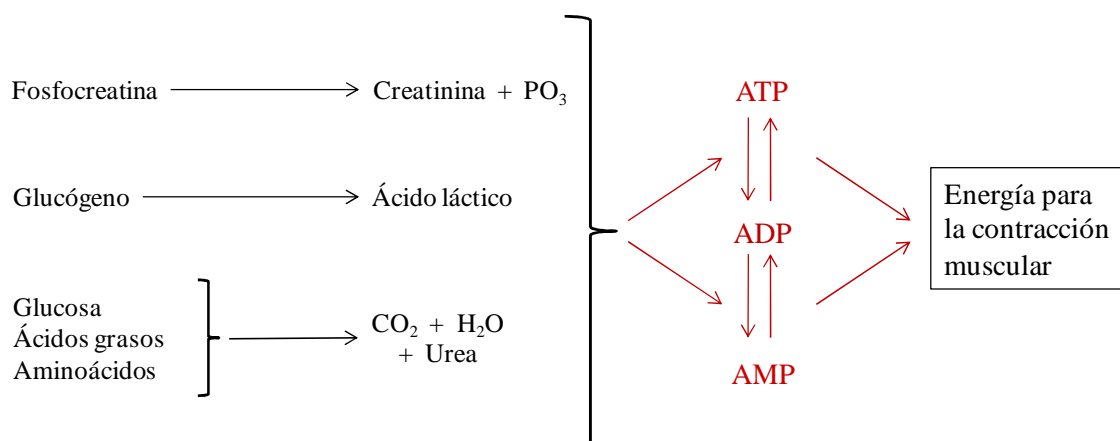


Imagen 13. Sistemas energéticos que aportan energía para la contracción muscular¹⁸.

Existe un solapamiento de estos tres sistemas energéticos, por lo que la vía energética utilizada predominantemente en una actividad física depende de su intensidad y su duración. El aporte energético en un músculo responde a una transición suave entre las fuentes aeróbicas y anaeróbicas, con un solapamiento considerable entre unas y otras¹⁸³. Dependiendo del tipo de esfuerzo los tres sistemas energéticos van a contribuir pero lo harán en distinto porcentaje¹⁸⁰.

Los factores determinantes en la utilización de los sustratos energéticos son: la intensidad del ejercicio (mayor intensidad, mayor contribución de los hidratos de carbono a la producción de energía), la duración (mayor duración, mayor contribución de las grasas), la cantidad de hidratos de carbono previa al ejercicio y el estado físico¹⁸². La vía aeróbica es la vía más lenta, de mayor duración y la más rentable para el organismo (mayor producción de ATP por unidad de sustrato). Por tanto, es la vía metabólica más importante en ejercicios de larga duración. Se utiliza en los deportes de resistencia (carrera de fondo, bicicleta, natación, remo...). Por último, cuando el ejercicio es suficientemente intenso y prolongado, se utiliza como sustrato metabólico aeróbico el metabolismo de los lípidos, por el cual los triglicéridos pasan al ciclo de Krebs produciendo piruvato y ATP.

La intensidad de un ejercicio puede expresarse en términos relativos a la capacidad funcional de cada persona, como porcentaje del consumo máximo de oxígeno (VO_{2 max}). El VO_{2 max} señala la capacidad de una persona para sintetizar ATP de forma aeróbica. El ejercicio que se realiza por

encima del $\text{VO}_2 \text{ max}$ solo puede tener lugar predominantemente por la vía energética de la glucólisis anaeróbica con formación de lactato, a pesar de que el metabolismo aeróbico sigue contribuyendo al aporte energético. En estas condiciones, se deteriora el rendimiento y la intensidad del ejercicio debe disminuir¹⁸³. Cuando se realiza un ejercicio intenso, por encima del umbral anaeróbico, la máxima concentración de lactato en sangre se obtiene una vez cesa el ejercicio, debido a que se tarda un tiempo en aclarar la gran concentración del ácido láctico acumulado en el músculo y es un indicador de la intensidad del trabajo anaeróbico realizado¹⁸⁴.

2. Tipos de ejercicio

Existen tres grandes tipos de ejercicio físico. El ejercicio de resistencia cardiorespiratoria, el ejercicio físico de fuerza o resistencia y el ejercicio de flexibilidad.

El ejercicio de resistencia cardiorespiratoria supone un trabajo fundamentalmente del aparato cardiorespiratorio e involucra el trabajo intenso de un número grande de músculos y puede ser a su vez de tipo aeróbico o anaeróbico. Por otro lado existen ejercicios físicos de fuerza o resistencia caracterizados por contracciones aisladas de grupos musculares que pretenden movilizar una carga o vencer una resistencia. Y por último, el ejercicio de flexibilidad que desarrolla la capacidad funcional de una articulación para moverse en todo su rango de movimiento.

El ejercicio físico según el tipo de contracción muscular se clasifica en dinámico o isotónico y estático o isométrico. El ejercicio dinámico es aquel en el que hay contracción y relajación sucesivas de las fibras musculares (correr, nadar...). Por sus características, suelen ser ejercicios prolongados que se realizan con consumo de oxígeno. Por ejercicio estático o isométrico se entiende aquel en el que se genera tensión en las fibras musculares sin cambios importantes en la longitud muscular (mantener la posición tras levantamiento de pesas...). En general, son ejercicios intensos y no suelen ser muy prolongados, en los que la utilización del oxígeno es escasa. En realidad, en la mayoría de los ejercicios el tipo de actividad muscular es mixta y su clasificación se hace en función del tipo de contracción predominante^{182,185}.

En la prescripción de ejercicio físico para el fomento de la salud, el ejercicio recomendado es el dinámico y aeróbico que implica los músculos largos durante periodos de tiempo largos (30-60 minutos, 2-6 veces por semana). Se considera indicado, de esta manera, caminar a ritmo vigoroso, subir escaleras, la carrera, natación, bicicleta, remo, juegos deportivos como fútbol, baloncesto y trabajo de tonificación muscular a través de circuitos de fuerza-resistencia⁸.

El ejercicio físico actúa como un estímulo que promueve respuestas adaptativas en todos aquellos órganos y sistemas que se ponen en funcionamiento durante la propia actividad física. Las respuestas beneficiosas al ejercicio se pueden observar en sistemas tan diversos como el cardiovascular, el locomotor, el metabólico o el neuroendocrino. Según este principio, el ejercicio actúa desequilibrando la homeostasis de estos sistemas, provocando respuestas y adaptaciones durante

el período de recuperación tras el ejercicio, cuyo fin será la defensa de dichos sistemas ante potenciales nuevas acciones desestabilizadoras.

3. Efectos del ejercicio físico

Se deben distinguir dos tipos de respuestas sistémicas al ejercicio, aguda y crónica. En cada sesión de entrenamiento se provocarán cambios hemodinámicos que constituyen la respuesta aguda al ejercicio y que tiene que ver con el consumo de oxígeno. La repetición periódica de estas sesiones de ejercicio nos conducirá a cambios adaptativos a largo plazo, al efecto crónico del ejercicio o efecto del entrenamiento¹⁸⁶.

3.1. Respuesta aguda

En el estudio de la fisiología del esfuerzo y del deporte es necesario el conocimiento de la respuesta del organismo a una serie individual de ejercicio que recibe el nombre de respuesta aguda.

Los ejercicios realizados por los deportistas durante las sesiones de entrenamiento provocan una serie de procesos denominados de adaptación aguda. Estos procesos son las respuestas de regulación homeostática, la activación del transporte de oxígeno y el uso de las reservas de energía. Cada ejercicio provoca un incremento de la demanda de oxígeno y la necesidad de eliminar el CO₂ producido¹⁸⁷. En consecuencia, la actividad de los sistemas cardiovascular y respiratorio también debe incrementarse. Durante el ejercicio se producen numerosos cambios cardiovasculares con el objetivo común de que el sistema satisfaga las demandas impuestas para desempeñar sus funciones con la máxima eficacia. Las adaptaciones fisiológicas están orientadas a mejorar la capacidad de elevar el flujo arterial a las masas musculares en movimiento. Los cambios se producen a nivel de los siguientes componentes del sistema cardiovascular¹⁸⁶:

- Frecuencia cardíaca
- Volumen sistólico
- Gasto cardíaco
- Flujo de la sangre
- Tensión arterial
- Sangre

Los cambios agudos en los valores de algunas magnitudes durante el ejercicio son debidos a las variaciones de volumen entre los compartimentos intravasculares e intersticiales, a la pérdida de volumen por el sudor y a los cambios en las concentraciones hormonales plasmáticas: un incremento de adrenalina, noradrenalina, glucagón, somatotropina, cortisol, corticotropina y una disminución de insulina¹⁸⁸. Además, el ejercicio produce un incremento de la utilización de oxígeno y una mayor

generación de radicales libres. La prolongada generación de radicales libres puede superar la capacidad antioxidante, provocando una descompensación del equilibrio antioxidante que conduce a una situación de estrés oxidativo en el músculo, hígado, sangre y otros tejidos, lo que lleva a fatiga y a daño tisular¹⁸⁹.

Este tipo de investigaciones pueden llevarse a cabo en un laboratorio o mediante un estudio de campo. Las pruebas de laboratorio permiten controlar las condiciones más cuidadosamente y además permiten realizar la medición directa del VO_2 max. En un laboratorio además pueden controlarse factores como la temperatura y el grado de humedad o la intensidad de la luz y del ruido en el área de la prueba, que pueden afectar a la reacción del organismo tanto en reposo como durante el ejercicio¹⁸⁶. La investigación de campo es menos controlable en este sentido. Sin embargo, tiene la ventaja de que la actividad física realizada por los participantes es más real en una prueba de campo que en el laboratorio. Con frecuencia las investigaciones, se llevan a cabo en ambos lugares con la finalidad de obtener un resultado más preciso y completo¹⁸⁶.

En las pruebas en el laboratorio también debe controlarse el esfuerzo físico del participante para proporcionar un ritmo constante y conocido. Esto se logra usando ergómetros (Imagen 14). Un ergómetro es un instrumento para hacer ejercicio que permite controlar o estandarizar y medir la intensidad y el ritmo del esfuerzo físico de una persona. En deportes como el piragüismo y el ciclismo existen ergómetros específicos, remoergómetros, kayak-ergómetros y cicloergómetros, que permiten someter a los deportistas a pruebas de un modo que se aproxima mucho al de sus entrenamientos o competiciones¹⁸⁶.



Imagen 14. Cicloergómetro y kayak-ergómetro.

3.2. *Efecto del entrenamiento*

Al examinar las reacciones agudas al ejercicio, se observa la reacción inmediata del organismo a una serie individual de ejercicio. Otra de las áreas de interés en la fisiología del esfuerzo y del deporte es la respuesta del organismo a lo largo del tiempo a las tensiones de series repetidas de ejercicio.

Cuando se realizan ejercicios regulares durante un determinado tiempo, el organismo se adapta. Las adaptaciones fisiológicas que se producen mejoran tanto la capacidad como la eficacia en el ejercicio y son específicas del tipo de entrenamiento que se sigue. Con el entrenamiento de resistencia, los músculos se fortalecen y con el entrenamiento aeróbico, el corazón y los pulmones ganan eficacia y se incrementa la capacidad de resistencia¹⁸⁶. Por otra parte, el entrenamiento produce un incremento de la capacidad antioxidante muscular que retrasa el fenómeno de fatiga. El ejercicio regular provoca unos cambios adaptativos en diversos sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la catalasa, como no enzimáticos, el glutatión, el urato, la bilirrubina, la ubiquinoma, las vitaminas E, C y los carotenoides¹⁸⁹.

Uno de los principios en los que se basan todas las formas de entrenamiento es el principio de periodización. La periodización es la disposición en ciclos graduales de la especificidad, intensidad y volumen de entrenamiento para conseguir niveles máximos de forma física para la competición. Con la periodización, el volumen e intensidad del entrenamiento varían a lo largo de un macrociclo, que suele abarcar un año de entrenamiento. Los macrociclos se componen de dos o más mesociclos determinados por las fechas de las competiciones importantes¹⁸⁶.

En resumen, las series individuales de ejercicio permiten obtener de forma aguda una respuesta metabólica y cardiovascular que es transitoria. Su comprensión puede ayudar a entender mejor las adaptaciones crónicas que lleva a cabo el organismo cuando se le somete a repetidas series de ejercicios, que se conocen como la respuesta al entrenamiento¹⁸⁶.

VIII. Marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular y ejercicio físico

La falta de actividad física es un problema de salud pública reconocido como un factor independiente de riesgo de enfermedad coronaria⁴⁹. Por el contrario, la actividad física regular y la buena forma física cardiovascular disminuyen la mortalidad total⁴⁸.

El corazón entrenado es capaz de realizar un trabajo más importante con menos gasto energético y la frecuencia cardíaca es más baja para un nivel de esfuerzo determinado. Cualquier factor implicado en la reducción del trabajo cardíaco ejerce un efecto favorable sobre la función cardiovascular, especialmente cuando la perfusión se encuentra comprometida a consecuencia de la presencia de placas de ateroma en las arterias coronarias⁸. El entrenamiento incrementa la capacidad funcional cardiovascular y disminuye la demanda de oxígeno cardíaca a cualquier nivel de actividad física en sujetos sanos, así como en la mayoría de sujetos con enfermedad cardiovascular.

La baja forma física parece asociarse con el desarrollo de diabetes, hipertensión y síndrome metabólico, tanto en sujetos jóvenes como de mediana edad. Los individuos con baja forma física presentan 3-6 veces más probabilidad de desarrollar estos factores de riesgo que los que presentan buena forma física¹⁹⁰. Esto ha llevado a las sociedades médicas a promover el ejercicio como parte de un estilo de vida cardiosaludable reconociendo que una actividad física adecuada contribuye al control y tratamiento de la enfermedad coronaria y de los FRC^{42,49}.

El ejercicio físico habitual modifica favorablemente algunos FRC, reduce y controla el peso corporal, además de contribuir a cambios en el estilo de vida en cuanto al abandono de hábitos tóxicos, en especial el tabaco, mantenimiento de dietas equilibradas y menos consumo de alcohol y se ha descrito que es efectivo en la reducción y el control del estrés^{41,76,191}. También existen datos sólidos que refuerzan la eficacia del ejercicio físico habitual en la reducción de la tensión arterial en personas con hipertensión leve o moderada. El entrenamiento puede reducir la tensión arterial sistólica y diastólica aproximadamente 10 mmHg en individuos con hipertensión esencial moderada¹⁸⁶.

Además, la práctica de ejercicio físico produce en el organismo una serie de cambios metabólicos que tienen su base en reacciones bioquímicas. El conocimiento de estos cambios metabólicos puede ayudar a identificar los efectos beneficiosos del ejercicio tanto en individuos sanos como en individuos con problemas cardiovasculares y a la utilización del ejercicio para equilibrar estados metabólicos inadecuados. Dentro de este grupo de efectos metabólicos relacionados con el riesgo cardiovascular, es importante el efecto del ejercicio en el control de la diabetes. El ejercicio mejora el control de la glucemia y la sensibilidad a la insulina y previene el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en pacientes de alto riesgo^{192,193}. Sin embargo, una de las modificaciones

metabólicas beneficiosas más importantes que se producen con la práctica de ejercicio físico es la que ejerce sobre los niveles de lípidos en sangre.

1. Lípidos

La práctica regular y moderada de ejercicio físico aeróbico se asocia a una mejora del perfil lipídico plasmático y un menor riesgo de arteriopatía coronaria y mortalidad cardiovascular^{194,195,196}. Existen evidencias de que la práctica de ejercicio físico en la población general tiene un efecto positivo en los niveles de lípidos y lipoproteínas.

Los datos de varios estudios coinciden en que la actividad física habitual puede ser utilizada para mejorar los niveles de colesterol, observándose una asociación positiva entre la actividad física y los niveles de cHDL, mientras que se observa una asociación negativa entre actividad y los niveles de colesterol total, cLDL y triglicéridos^{197,198,199,200,201}. Aunque los mecanismos que subyacen a este efecto no están totalmente aclarados, algunos autores lo han relacionado con el aumento o inducción de la actividad enzimática. Con el entrenamiento se han observado elevaciones en la actividad de la LCAT y de la LPL^{202,203}. Esta última facilitaría el catabolismo de las lipoproteína ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) proporcionando más sustrato para la síntesis hepática de HDL²⁰⁴.

El tipo de ejercicio y el nivel de intensidad de los ejercicios realizados en los entrenamientos parece influir en su efecto sobre los cambios en el perfil lipídico. Con respecto al entrenamiento de resistencia parece que el entrenamiento de baja-moderada intensidad resulta más beneficioso para el perfil lipídico que el entrenamiento de resistencia de alta intensidad²⁰⁵ y que un mayor número de repeticiones en los entrenamientos, tiene un mayor impacto sobre el perfil lipídico que una mayor intensidad^{205,206}.

Si revisamos el efecto del ejercicio agudo tras una serie individual de ejercicio físico, muchos de los estudios realizados encuentran elevaciones de la concentración de colesterol total que se acompañan de un aumento de cHDL entre el 4 y el 43%^{207,208,209,210,211,212}. En estos trabajos el aumento del cHDL, en general, se describe como paralelo a la disminución de triglicéridos lo que sugeriría cambios metabólicos similares o relacionados. El incremento en el cHDL en sujetos sedentarios parece ser debido al aumento en la fracción HDL3, mientras que en individuos entrenados aumenta más la fracción HDL2²¹⁰. Algunos autores describen diferencias en el incremento en los niveles de cHDL tras una prueba de esfuerzo de forma dependiente de la intensidad del ejercicio^{213,214}.

Con respecto al cLDL, algunos autores han descrito ausencia de cambios en las concentraciones tras la realización de un ejercicio agudo^{207,210,212,215}, aunque otros autores encuentran que la concentración de cLDL disminuye significativamente tras diferentes pruebas de esfuerzo en individuos entrenados^{209,214,216}.

Por otra parte, el efecto que ejerce el ejercicio sobre otros marcadores lipídicos de riesgo cardiovascular ha sido mucho menos estudiado^{217,218}. Los trabajos publicados acerca del efecto en las

apolipoproteínas y la lp(a) muestran resultados, en general contradictorios. Se han descrito efectos beneficiosos del entrenamiento en la disminución de las concentraciones de apoA y apoB. Los atletas de resistencia presentan en general concentraciones de apolipoproteínas A-I y A-II un 25% y 15% más altas que los individuos sedentarios^{219,220}, mientras que las concentraciones de apoB, son un 6-7% inferiores^{203,221}. Sin embargo, según otros autores, la práctica de ejercicio físico de forma regular no parece modificar los niveles de las apolipoproteínas^{222,223,224}.

Con respecto al efecto del ejercicio agudo tras series individuales de ejercicio en las apolipoproteínas, los resultados también son muy variables. En la mayoría de los estudios realizados en hombres normocolesterolémicos, las concentraciones de apoA y apoB no se alteran significativamente tras el ejercicio agudo^{210,215,225,226}. Sin embargo, se ha descrito un aumento transitorio en las concentraciones de apolipoproteínas tras la realización de una sesión de ejercicio en hombres hipercolesterolémicos²³⁸, mientras que otros autores describen disminuciones de las concentraciones de apoB y elevaciones de apoA tras la realización de un ejercicio intenso en atletas e individuos sedentarios sanos^{216,227,228,229}.

Existe relativamente poca información sobre la lp(a). Aunque algunos estudios han confirmado una relación favorable entre el entrenamiento y las concentraciones plasmáticas de lp(a)^{222,223}, otros estudios no encuentran diferencias en sus niveles entre sujetos entrenados y sedentarios^{221,230,231} y algunos revelaron valores mayores de lp(a) en sujetos entrenados^{232,233}. A pesar de que existen bastantes estudios que evalúan los efectos del ejercicio agudo en los lípidos y las apolipoproteínas, existe menos información disponible en lo que concierne al efecto de una única sesión de ejercicio agudo en la lp(a). Sin embargo, los resultados publicados al respecto coinciden en que no se observan diferencias en la concentración de lp(a) tras la realización de un ejercicio agudo^{234,235,236}.

La reducción de los niveles de triglicéridos con el ejercicio agudo fue descrita por primera vez en 1964 por Holloszy *et al.*²³⁷ en individuos hipertriglicéridémicos y posteriormente por otros autores. Este efecto no se describe como inmediato sino que ocurre 18-24 horas después del ejercicio, persiste hasta las 72h^{207,208,214,216,238,239,240,241,242} y es mayor en individuos con valores más altos de triglicéridos antes del ejercicio²³⁹.

Dada la estrecha relación de los mecanismos implicados en la regulación de los lípidos séricos, el estudio del efecto del ejercicio físico en estos marcadores puede aportar una mayor información si estos se analizan de forma conjunta. Sin embargo, hasta el momento, no se ha abordado en profundidad la valoración conjunta de todos estos marcadores y dadas las diferentes metodologías y modelos experimentales utilizados resulta difícil realizar una comparación de los efectos individuales observados.

2. Marcadores inflamatorios

El beneficio del ejercicio físico también parece relacionado con sus efectos sobre el proceso inflamatorio vascular. La actividad física regular y el entrenamiento se han asociado con una acción antiinflamatoria crónica que se reflejaría en los niveles de la PCR^{243,244}. Sin embargo, el ejercicio agudo produce a corto plazo una respuesta inflamatoria transitoria, reflejada en un incremento de los reactantes de fase aguda, tales como la PCR_{us}, la proteína amiloide A, α -1 glicoproteína ácida^{245,246}, y algunas citocinas como las interleucinas IL-1 y IL-6²⁴³.

Algunos trabajos demuestran una relación inversa entre la actividad física regular y la concentración sérica de PCR^{247,248}, describiendo diferencias en los efectos del entrenamiento físico sobre la PCR con el tipo de ejercicio^{247,249}. Dufaux *et al.*²⁴⁷ también han descrito diferencias en los niveles séricos de PCR, más bajos en nadadores que en remeros y a su vez en remeros más bajos que en futbolistas.

Los efectos de diversos tipos de ejercicio en los marcadores de inflamación también fueron estudiados por King *et al.*²⁴⁹ que examinaron una cohorte de 4072 participantes en el estudio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) del CDC (Centers for Disease Control and Prevention), de edades entre 17 y 65 años y que incluye información acerca del tipo y frecuencia de ejercicio realizado durante un mes. Algunas actividades como el footing, natación, ciclismo o aeróbic, realizados en más de 12 ocasiones durante un mes, se asociaron con una menor probabilidad de elevación de los marcadores inflamatorios. Utilizando un análisis bivariado para comparar diferentes formas de ejercicio, los corredores y los participantes que practicaban aeróbic tenían concentraciones significativamente más bajas de los marcadores de inflamación en comparación con los ciclistas, los nadadores, y los levantadores de pesas.

Existen muchos estudios prospectivos que han demostrado una asociación directa entre la PCR y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, son pocos los que han evaluado las asociaciones entre los niveles de PCR y otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular^{250,251,252}. Rohde *et al.*²⁵⁰ evaluaron la relación de la PCR y varios marcadores de riesgo cardiovascular en 1172 varones aparentemente sanos y encontraron asociaciones positivas entre los niveles de PCR y parámetros como la edad, número de cigarrillos al día, el índice de masa corporal, presión arterial sistólica y diastólica, colesterol total, triglicéridos, lp(a), apoB, homocisteína y se observaron asociaciones inversas con el cHDL y la apoA.

Con respecto a la respuesta aguda al ejercicio, estudios realizados en corredores demostraron elevaciones transitorias de la concentración de PCR tras las carreras, inmediatamente y 24 horas tras la finalización de la prueba, que volvían a sus valores basales entre el segundo y sexto día^{253,254,255}. Strachan *et al.*²⁵⁶ han descrito que esta respuesta en la fase aguda tras el ejercicio parece ser proporcional a la cantidad de actividad y de lesión o daño muscular. En 38 corredores entrenados después de la competición se observó un incremento de las concentraciones de PCR, proporcional a la

duración de la carrera y a las concentraciones séricas de creatina quinasa (CK). La respuesta aguda también parece relacionada con el tipo de ejercicio y la masa muscular involucrada. Así, un estudio realizado en 14 sujetos no entrenados, no evidenció ninguna elevación en los marcadores inflamatorios tras la realización de un ejercicio excéntrico de los flexores del codo, a pesar de la elevación de los niveles de CK²⁵⁷.

Algunos autores^{258,259,260} han señalado que la lp(a) es también un reactante de fase aguda positivo, es decir, que los niveles plasmáticos de lp(a) aumentan durante la inflamación, por lo que puede resultar de interés evaluar la posible relación entre la elevación de un marcador estrictamente inflamatorio como la PCRus y otro mixto como la lp(a), con el ejercicio.

3. Equilibrio tiol-redox

El estudio de los niveles plasmáticos de homocisteína total y su equilibrio redox podría ser útil para comprender las alteraciones y los mecanismos asociados al estrés oxidativo ocasionado por el ejercicio.

En la última década muchos de los estudios realizados se han centrado en la evaluación de la reducción de la concentración de homocisteína con el entrenamiento, mostrando en general una asociación inversa entre los niveles de actividad física y la concentración de homocisteína^{261,262,263,264,265,266,267}, aunque también se han realizado estudios que muestran resultados contradictorios. Mientras que algunos revelan una disminución de la homocisteína con el entrenamiento, otros estudios han observado ausencia de cambios²⁶⁸ o incluso incrementos en la concentración de homocisteína^{269,270}. En cuanto al ejercicio de resistencia también existen estudios en los cuales se observa que la homocisteína disminuyó tras un programa de entrenamientos^{271,272}.

Dado que los sujetos con estilos de vida activos tienden a ser más conscientes de otros factores beneficiosos para la salud, tales como reducción del consumo de alcohol, la dieta y el tabaco, es difícil establecer una relación causal entre la actividad física diaria y la reducción de los niveles de homocisteína²⁷³. El estudio del efecto del nivel de entrenamiento dentro de un grupo de individuos en el que se controlen estas variables relacionadas con el estilo de vida, puede ser de utilidad para comprender el efecto propio del ejercicio físico habitual en las concentraciones de homocisteína eliminando la influencia de otros factores.

Para entender las adaptaciones fisiológicas al ejercicio, es importante también el análisis de los cambios que ocurren en el ejercicio agudo y que en el caso de la homocisteína debe, además, estudiarse desde el punto de vista del ejercicio intenso o prolongado como una forma de estrés metabólico y oxidativo. El ejercicio de forma aguda produce un incremento de la utilización de oxígeno y una mayor generación de radicales libres que podrían influir en el equilibrio redox de las moléculas portadoras de grupos tioles y en concreto de la homocisteína, por lo que el análisis de las

diferentes formas moleculares de la homocisteína plasmática podría ser un indicador indirecto de la capacidad de respuesta antioxidante.

Con respecto a la respuesta aguda a las series individuales de ejercicio, la mayoría de los estudios muestran un aumento de los niveles de homocisteína^{274,275,276,277,278} aunque algunos autores discrepan y muestran un descenso^{279,280,281} o ausencia de variación²⁸². La mayoría de estos estudios se realizan en individuos entrenados aunque recientemente también ha sido descrita una elevación transitoria de homocisteína en individuos sedentarios que realizaron un ejercicio agudo a diferentes intensidades²⁸³. Las discrepancias encontradas parecen estar relacionadas con la heterogeneidad en los diseños experimentales, así como con el empleo de fórmulas inapropiadas en la corrección de cambios en el volumen de plasma. Además, se han descrito cambios dinámicos en las concentraciones de homocisteína durante el ejercicio y durante el periodo de recuperación que podrían explicar esta disparidad en los resultados²⁸³.

4. Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica

En los años noventa, Delp *et al.*²⁸⁴ publicaron que 12 semanas de entrenamiento físico en ratas mejoraban la relajación endotelial en respuesta a la infusión de un vasodilatador dependiente del endotelio, la acetilcolina. Desde entonces ha sido creciente el interés y el estudio del ejercicio físico como una estrategia para la mejora de la función endotelial.

Uno de los efectos cardioprotectores del ejercicio físico se debe a su acción sobre la función endotelial de las arterias coronarias. La práctica regular de ejercicio físico mejora la función endotelial en individuos con disfunción endotelial y con diferentes patologías como obesidad, síndrome metabólico, diabetes y enfermedad vascular²⁸⁵. Además, algunos autores han descrito la capacidad del ejercicio en entrenamiento para incrementar la vasodilatación dependiente del endotelio vascular, la biodisponibilidad del NO^{286,287,288} y tanto la expresión proteica de eNOS como su actividad^{289,290}.

Cuando se realiza ejercicio físico, la irrigación sanguínea de los tejidos se modifica según su actividad metabólica, produciéndose una redistribución sistémica del flujo sanguíneo determinada por la estimulación simpaticoadrenal²⁸⁵. En los vasos sanguíneos actúan dos tipos de fuerzas, la pulsatilidad, determinada por la presión arterial que actúa de forma perpendicular a los vasos, y las fuerzas de cizallamiento, provocadas por el flujo vascular que actúan de forma paralela a los vasos. El ejercicio físico provoca un aumento en el flujo sanguíneo que aumenta las fuerzas de cizallamiento sobre la pared vascular que a su vez están relacionadas con la velocidad y viscosidad de la sangre. Este fenómeno es el principal estímulo para la síntesis de NO que tiene como objetivo final el incremento del diámetro del vaso, por la vasodilatación, como respuesta normal de las arterias al incremento del flujo^{16,18}. Así, los vasos con grandes áreas de cizallamiento suelen estar libres de lesiones ateroscleróticas, mientras que las zonas de bajo estrés suelen tener mayor tendencia a la aterosclerosis²⁹¹.

El ejercicio podría tener también un efecto importante en la producción de factores que afectan a la biodisponibilidad de NO, como el inhibidor competitivo de la eNOS, ADMA. Sin embargo, a pesar de que el papel del ADMA como marcador de riesgo cardiovascular se ha visto reflejado en el incremento de estudios publicados en los últimos años, existe poca información acerca del efecto producido por el ejercicio físico en los niveles plasmáticos de ADMA y nunca referido a individuos sanos.

El efecto de la actividad física sobre las concentraciones circulantes de ADMA ha sido valorado recientemente en pacientes con diferentes patologías^{292,293,294,295,296,297,298,299}, observándose en todos estos estudios una disminución de la concentración de ADMA tras la participación en un programa de entrenamiento basado en ejercicio aeróbico controlado.

Dado que el ejercicio físico induce cambios en el metabolismo de las proteínas, los glúcidos y los aminoácidos, así como en la función renal, que podrían afectar a la producción y eliminación de homocisteína y de ADMA, una evaluación conjunta de todos ellos puede ayudar a comprender los efectos metabólicos del ejercicio en estos marcadores de riesgo cardiovascular.

Hipótesis de trabajo y objetivos

Los efectos de la actividad física en los factores de riesgo asociados con la enfermedad cardiovascular pueden explicarse por las adaptaciones fisiológicas que se producen en la musculatura esquelética y cardíaca, en el volumen sanguíneo circulatorio y, de manera muy importante, por las modificaciones metabólicas asociadas. Una forma de valorar el impacto del entrenamiento en la prevención de las enfermedades cardiovasculares es ver su efecto sobre los FRC, en la suposición de que modificando los FRC a escala individual o poblacional, a largo plazo, se podría disminuir la morbilidad y mortalidad cardiovascular.

La práctica de ejercicio físico produce en el organismo una serie de cambios metabólicos y el conocimiento de estos cambios puede ayudar a identificar los efectos beneficiosos del ejercicio y a la utilización del ejercicio para equilibrar los estados metabólicos inadecuados. Además, el efecto del ejercicio en cuanto a las modificaciones metabólicas asociadas puede ser estimado directa y cuantitativamente. Por todo ello, en este trabajo centramos nuestra atención en la influencia del ejercicio en los marcadores de riesgo cardiovascular de tipo metabólico.

A pesar de que los mecanismos de acción de los FRC pueden ser diferentes, en algunos casos se han encontrado ciertas asociaciones y, concretamente, los marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular suelen estar íntimamente interrelacionados. La realización de ejercicio físico puede modificar simultáneamente varios de ellos en una determinada dirección y cambiar el riesgo cardiovascular del individuo. Por este motivo, establecer los cambios producidos en algunos de ellos de forma aislada podría resultar insuficiente y su abordaje de forma conjunta puede aportar mayor información. Por otra parte, mientras que el efecto del ejercicio sobre los marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular tradicionales está mejor documentado, el efecto que ejerce sobre los marcadores emergentes no ha sido adecuadamente estudiado ni totalmente reconocido y, en algunos casos, no se ha valorado en individuos sanos.

El ejercicio intenso o prolongado representa una forma de estrés metabólico y oxidativo. Las sesiones aisladas de ejercicio agudo provocan una respuesta metabólica transitoria, mientras que el efecto crónico del ejercicio incluye cambios permanentes o adaptaciones que se producen como resultado del entrenamiento. Muchos de los cambios potencialmente favorables en los marcadores metabólicos tienen un componente de efecto agudo y un componente de efecto crónico y, por tanto, los cambios que se producen con el ejercicio deben ser abordados desde estos dos puntos de vista para comprender los mecanismos fisiológicos implicados.

La realización de un estudio sobre los efectos metabólicos del ejercicio y del entrenamiento en individuos no entrenados de la población general plantea numerosas dificultades, por la imposibilidad de controlar variables como el estado basal de salud en relación a la edad, el tipo y periodicidad de la actividad física realizada o la posible incapacidad para alcanzar el nivel de esfuerzo requerido para que un marcador metabólico se vea afectado, de manera que se puedan evaluar los efectos con la suficiente sensibilidad.

De acuerdo con todo lo anterior, el objetivo general del trabajo recogido en esta memoria de tesis doctoral ha sido evaluar el efecto del ejercicio en los marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular en deportistas de alto nivel, atendiendo tanto a la respuesta aguda al ejercicio como a la adaptación al entrenamiento. Para ello, se han considerado dos disciplinas deportivas, como el ciclismo y el piragüismo, que representan dos modelos apropiados de ejercicio ya que combinan una elevada carga de entrenamiento con unas pruebas físicas intensas y prolongadas a lo largo de varios días, y que permiten estudiar posibles diferencias en cuanto al tipo de ejercicio al tratarse, respectivamente, de un ejercicio aeróbico y de un ejercicio de fuerza. Además, la selección de deportistas semiprofesionales ha permitido controlar factores como la edad, el consumo de tabaco y alcohol o la dieta.

Por todo ello, los objetivos planteados fueron los siguientes:

- Analizar los cambios que ocurren en el volumen plasmático como consecuencia de la realización de las pruebas físicas a través del hematocrito y de la concentración de hemoglobina para, posteriormente, realizar una corrección de las concentraciones observadas tras el ejercicio y poder comparar sus efectos directos en los marcadores estudiados.
- Revisar cambios bioquímicos relacionados con el ejercicio en el estado metabólico general y evaluar su relación con los producidos en los marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular. Esto incluye el estudio de la función renal, del metabolismo de las proteínas, de la glucosa, entre otros.
- Comparar los efectos de una sesión de ejercicio intenso y del entrenamiento sobre los marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular abordándolos individualmente:
 - Valoración de los marcadores lipídicos tradicionales (colesterol total, cLDL y cHDL) en comparación con los marcadores de tipo lipídico de más reciente consideración, como las apolipoproteínas A-I y B, la lp(a) o los triglicéridos.
 - Análisis del efecto del ejercicio y del entrenamiento sobre un marcador de lesión en el endotelio vascular de tipo inflamatorio, la PCRus.
 - Evaluación del efecto producido por el ejercicio y el entrenamiento en la homocisteína plasmática, así como, indirectamente, en los procesos relacionados con el estrés oxidativo a través de la estimación de las modificaciones del equilibrio redox de este aminotiol.
 - Estudio de las modificaciones que se producen como consecuencia de la realización de ejercicio físico y del entrenamiento en la respuesta vasodilatadora del endotelio a través de marcadores como el NO y el ADMA, así como de sus metabolitos relacionados, la L-arginina y la L-citrulina, y los ratios arginina/ADMA y ADMA/SDMA, con la finalidad de dilucidar posibles mecanismos subyacentes.

- Evaluar las posibles asociaciones en los cambios observados en los niveles circulantes de los marcadores estudiados.

Material y métodos

I. Individuos

El estudio se ha realizado en un grupo de 20 ciclistas pertenecientes a equipos semiprofesionales y 22 piragüistas de élite nacional, que fueron estudiados en diferentes momentos a lo largo de la temporada deportiva. Los individuos participaron indistintamente en cada momento de la temporada, 29 en temporada baja (15 ciclistas y 14 piragüistas) y 31 en temporada alta (18 ciclistas y 13 piragüistas). 11 ciclistas y 4 piragüistas participaron en los dos momentos de la temporada de entrenamientos.

En la selección del grupo experimental se ha pretendido minimizar la influencia de factores que podrían afectar a los marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular analizados, ya que representan un grupo homogéneo en cuanto a diferentes parámetros: son varones, no fumadores ni consumidores de alcohol y con dieta controlada y homogénea³⁰⁰ a lo largo de toda la temporada deportiva al encontrarse bajo seguimiento médico-deportivo por la Fundación Deportiva Municipal de Avilés. Los deportistas participantes en el estudio fueron seleccionados tras realizarles un chequeo médico y un estudio analítico completo. Todos los participantes dieron su consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Principado de Asturias.

	Ciclistas	Piragüistas
Edad, años^{***}	20 ± 1	17 ± 1
Altura, cm	172,4 ± 4,6	177,7 ± 1,4
Peso, kg^{***}	67,2 ± 1,0	75,1 ± 1,4
% Graso^{**}	9,7 ± 0,2	11,2 ± 0,5
SM4, mm^{**}	25,9 ± 1,4	35,7 ± 3,1
SM6, mm^{**}	39,1 ± 1,8	57,6 ± 5,5
VO₂ max, mL	4788 ± 75	4552 ± 172
VO₂ max, mL/kg.min^{***}	72 ± 1	59 ± 2

Tabla 4. Datos antropométricos de los individuos participantes. Valores expresados como media ± SEM. SM4, suma de 4 pliegues cutáneos; SM6, suma de 6 pliegues cutáneos; VO₂ max, consumo máximo de oxígeno. Diferencias significativas entre los grupos: ^{***} p<0,001; ^{**} p<0,01.

Todos los participantes realizaron la prueba después de un período de ayuno de 8 horas sin restricción de la ingesta de agua.

Los participantes realizaron una prueba de esfuerzo en dos momentos diferentes de la temporada deportiva; al inicio de la misma, en un período de entrenamientos de baja o moderada intensidad (temporada baja), y tras 5-7 meses de entrenamiento, cuando los deportistas se encuentran en un período de entrenamientos en los que se realizan cargas de trabajo de intensidad alta o muy alta y compiten a nivel nacional e internacional (temporada alta).

En temporada baja, las pruebas de esfuerzo se realizaron en un laboratorio deportivo. Los piragüistas realizaron la prueba en un kayak-ergómetro (Modest, Odense, Dinamarca) y los ciclistas en

un cicloergómetro (Orion S.T.E., Toulouse, Francia). Las pruebas consistieron en la realización de un ejercicio continuo de intensidad creciente, con una duración máxima entre diez y quince minutos, hasta alcanzar niveles máximos de esfuerzo. La terminación de la prueba tiene lugar en cada caso, tras alcanzar la frecuencia cardiaca máxima teórica, al obtener una meseta o no aumentar el volumen de consumo de oxígeno (VO_2) con el incremento de la carga, lo que representa el nivel máximo de VO_2 ($\text{VO}_{2\text{max}}$).

El control de la prueba se llevó a cabo mediante la valoración de la capacidad funcional y de la respuesta metabólica instantánea al ejercicio, registrando la frecuencia cardiaca de los deportistas mediante pulsómetros telemétricos (Polar, Finlandia) y mediante un sistema de análisis de gases espirados (Vmax, SensorMedics, USA).

En temporada alta, las pruebas se llevan a cabo durante la participación de los deportistas en competiciones reales en condiciones controladas y reguladas. En el caso de los piragüistas, los deportistas participaron en una competición real en el agua (Campo de Regatas de Trasona, Asturias), sobre una distancia de 5000 metros y en el caso de los ciclistas, participaron en una etapa en línea de 150 km en carretera durante una competición oficial por etapas (Torrelavega, Cantabria).

II. Muestras y conservación

Las muestras de sangre fueron extraídas por venopunción, antes y 30±5 minutos después de las pruebas. Las muestras fueron transportadas refrigeradas inmediatamente al laboratorio y centrifugadas durante 5 min a 3000 g. En cada extracción, se obtuvieron los cuatro tubos de sangre que se detallan a continuación:

- Un tubo de 4,5 mL de sangre anticoagulada con citrato sódico acidificado a pH 4,3 (Stabilyte, Biopool). Tras centrifugar se separaron alícuotas de plasma (1 mL) y se conservaron a -70°C , para la determinación de rHcy y tHcy.
- Un tubo de 9 mL de sangre sin anticoagular (Vacuette, Greiner Bio-one). Tras 20-30 minutos se centrifugaron a temperatura ambiente y se separaron alícuotas de suero (1 mL) que se congelaron a -20°C en oscuridad. Estas alícuotas se utilizaron para la determinación de metilargininas, NO, apoA, apoB, lp(a), PCRus, colesterol total, cHDL, triglicéridos así como otras magnitudes bioquímicas generales dentro del estudio analítico completo que se realizó a los deportistas.
- Un tubo de 5 mL de sangre anticoagulada con heparina de litio (Vacuette, Greiner Bio-one) para la determinación de aminoácidos, del que se separaron alícuotas de plasma (1 mL) tras su centrifugación en frío y se congelaron a -70°C .
- Un tubo de 5 mL de sangre anticoagulada con $\text{K}_3\text{-EDTA}$ (Vacuette, Greiner Bio-one) para la determinación inmediata de la concentración de hemoglobina y del hematocrito, además de otras magnitudes hematológicas generales dentro del estudio analítico completo.



Imagen 15. Esquema de obtención de muestras.

III. Material e instrumentación

Reactivos generales

- 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato (SBDF) (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Acetato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Acetonitrilo HPLC (High Purity Liquid Chromatography) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido bórico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido etilendiamino tetracético (EDTA) sal tripotásica dihidrato (Panreac, Barcelona, España).
- Ácido tricloroacético (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cloruro sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Columnas de extracción en fase sólida Oasis MCX, sorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico, 1mL 30 mg (Oasis, Milford, MA, USA).
- Dihidrógeno fosfato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hidrógeno fosfato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Membranas de celulosa regenerada con límite de peso molecular 10.000 Microcon Ultracel YM-10 (Millipore, Bedford, USA).
- Membranas para filtración de fases móviles de 0,22 µmol/L (Millipore, Bedford, USA).
- Metanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Trietilamina (TEA) (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Los reactivos utilizados para las determinaciones basadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron del grado de calidad requerido.

Kits comerciales de reactivos

- AccQ-Fluor (Waters, Milford, MA, USA) utilizado para la determinación de metilargininas que incluye: reactivo de derivatización AccQ (carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimida), diluyente (acetonitrilo) y tampón borato.
- Ensayo colorimétrico para óxido nítrico (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania), que incluye: tampón fosfato de potasio pH 7.5, coenzima NADPH y FAD en comprimidos, nitrato reductasa liofilizada, reactivos colorantes sulfanilamida y N-(1-naftil)etilendiamina, nitrato de

potasio 80 mM, placas microtiter.

- PicoTag (Waters, Milford, MA, USA), utilizado para el análisis cromatográfico de aminoácidos, que incluye:
 - reactivo de derivatización; fenilisotiocianato (PITC)
 - eluyente 1; TEA al 0,05% en una disolución de acetato sódico 0,14 M pH 6,40:acetonitrilo (94:6)
 - eluyente 2; acetonitrilo:metanol:agua (45:15:40)
 - diluyente para muestras; acetonitrilo:agua (4:96)
- Reactivos para la determinación en autoanalizadores (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania):
 - **Glucosa:** ensayo colorimétrico enzimático que incluye hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en solución tampón HEPES [ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)] pH 8.0 y NADPH y ATP en tampón MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] pH 6.0.
 - **Creatinina:** ensayo colorimétrico mediante reacción cinética de Jaffé amortiguada sin desproteinización, que incluye tampón fosfato de potasio pH>13.5 y ácido pícrico.
 - **Urea:** ensayo colorimétrico cinético que incluye ureasa, glutamato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato y NADH en tampón TRIS [tri(hidroximetil)aminometano] pH 8.6.
 - **Urato:** ensayo colorimétrico enzimático que incluye uricasa, peroxidasa y 4-aminofenazona en tampón fosfato a pH 7.8.
 - **Proteínas totales:** ensayo colorimétrico que incluye hidróxido de sodio, tartrato sódico-potásico, yoduro potásico y sulfato de cobre.
 - **Albúmina:** ensayo colorimétrico que incluye verde de bromocresol en tampón citrato a pH 4.1.
 - **Colesterol:** ensayo colorimétrico enzimático que incluye 4-aminofenazona, fenol, éter poliglicólico de alcohol graso, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa en tampón PIPES [ácido piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)] pH 6.8.
 - **Colesterol HDL:** ensayo colorimétrico enzimático homogéneo que incluye sulfato de dextrano, nitrato de magnesio hexahidratado, colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas a polietilenglicol, en solución tampón HEPES pH 7.4.
 - **Triglicéridos:** ensayo colorimétrico enzimático que incluye lipoprotein lipasa, gliceroquinasa, glicerol fosfato oxidasa, 4-aminofenazona y 4-clorofenol en solución tampón PIPES pH 7.4 y Mg²⁺ 40 mmol/L.
 - **Apolipoproteína A-I:** ensayo inmunoturbidimétrico que incluye: anticuerpos anti-apolipoproteína A-I humana y polietilenglicol en solución tampón TRIS pH 8.0.
 - **Apolipoproteína B-100:** ensayo inmunoturbidimétrico que incluye: anticuerpos anti-apolipoproteína B humana y polietilenglicol en solución tampón TRIS pH 8.0.

- **Lipoproteína (a):** ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas que incluye partículas de látex revestidas con anticuerpos policlonales anti-Ip(a) humana en tampón de glicina pH 9.6 y polietilenglicol en tampón fosfato a pH 7.5.
- **PCR ultrasensible:** ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas que incluye partículas de látex recubiertas con anticuerpos de ratón anti-PCR en tampón de glicina y tampón TRIS con albúmina de suero bovino e inmunoglobulinas de ratón.

Reactivos para la preparación de patrones

- Cisteamina (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Homocisteína (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Metionina sulfona (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- N^G,N^G-dimetilarginina asimétrica di-HCl (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- N^G,N^{G'}-dimetilarginina simétrica dicloruro (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).
- N-metil arginina acetato (Fluka, St. Louis, MO, USA).
- N-propil arginina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).
- Soluciones para calibración de aminoácidos acido-neutros y básicos (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Materiales de control

- Liquichek Homocysteine Control (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA), como material de control para la homocisteína.
- Precinorm U y Precipath U (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), como material de control para glucosa, urea, creatinina, urato, proteínas totales, albúmina, colesterol, cHDL, triglicéridos, apolipoproteína A-I, apolipoproteína B, lipoproteína (a) y PCR ultrasensible.

Columnas cromatográficas

Para el análisis cromatográfico se emplearon los siguientes tipos de columnas y precolumnas (Waters, Milford, MA, USA):

- Columna Symmetry C₁₈ (150 mm x 4,6 mm i.d.; 5 µm) y precolumna Sentry C₁₈ (20 mm x 3,9 mm i.d.; 3,5 µm), para la determinación de homocisteína.
- Columna Symmetry C₁₈ (100 mm x 4,6 mm i.d.; 3,5 µm), para la determinación de metilargininas.
- Columna PicoTag C₁₈ (300 mm x 3,9 mm i.d.; 4 µm), para la determinación de aminoácidos.

Instrumentación empleada

- Sistema cromatográfico y software Breeze (Waters, Milford, MA, USA), compuesto de:
 - Waters 1525 Binary HPLC Pump.
 - Waters 717 plus Autosampler.
 - Waters 2475 Multi λ Fluorescence Detector.
 - Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector.
- Analizador hematológico Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Autoanalizadores Modular Analytics SWA y Cobas e501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).
- Basic Robotic Immunoassay Operator BRIO (Seac Radim Group, Florencia, Italia)

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada ultrapura (resistividad 18,2 m Ω .cm) obtenido de un sistema Mili-Q (Millipore, Bedford, USA).

IV. Determinaciones analíticas

1. Métodos automatizados

Las magnitudes que se muestran en la Tabla 5 fueron analizadas en suero mediante métodos automatizados, según los procedimientos de la casa comercial (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se muestran las características principales de los métodos empleados así como la imprecisión analítica con la que se ha trabajado.

Analizador	Parámetro	Principios del test	CV _{intraserie}	CV _{interserie}
Modular Analytics SWA	Glucosa	Enzimático colorimétrico (hexoquinasa)	0,71-1,11 %	0,62-1,31 %
	Urea	Enzimático colorimétrico (ureasa/glutamato deshidrogenasa)	0,90-1,00 %	1,00-1,20 %
	Creatinina	Colorimétrico (método de Jaffé)	1,11-2,06 %	1,47-1,75 %
	Urato	Enzimático colorimétrico (uricasa/peroxidasa)	0,66-0,83 %	0,85-1,20 %
	Proteínas totales	Colorimétrico (reacción de Biuret)	0,60-0,64 %	0,68-0,86 %
	Albúmina	Colorimétrico (verde de Bromocresol)	1,24-1,44 %	1,38-1,84 %
	Colesterol	Enzimático colorimétrico (colecosterolerasa/colecsteroloxidasa/peroxidasa)	0,97-1,26 %	1,33-1,59 %
	Colesterol HDL	Enzimático colorimétrico (PEG-colecosterolerasa/PEG-colecsteroloxidasa/peroxidasa)	0,60-1,11 %	0,91-1,45 %
Cobas c 501	Triglicéridos	Enzimático colorimétrico (lipasa lipoproteica/glicerolquinasa/glicerol fosfato oxidasa)	0,78-2,14 %	1,55-1,62 %
	PCRus	Inmunoturbidimétrico potenciado por partículas de látex	0,4-1,6 %	1,3-8,4 %
	Apolipoproteína A	Inmunoturbidimétrico	1,0-1,5 %	1,4-4,7 %
	Apolipoproteína B	Inmunoturbidimétrico	1,1-1,8 %	2,3-3,1 %
	Lipoproteína (a)	Inmunoturbidimétrico potenciado por partículas de látex	0,8-1,7 %	1,2-2,2 %

Tabla 5. Datos específicos de la determinación de algunas magnitudes. CV_{intraserie} y CV_{interserie}: coeficientes de variación intra e interserie obtenidos en el laboratorio mediante sueros control comerciales.

El cLDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald⁶³:

$$\text{cLDL} = \text{Colesterol total} - \left(\text{cHDL} + \frac{\text{triglicéridos}}{5} \right)$$

Las muestras de sangre total para la determinación de hemoglobina y hematocrito se analizaron mediante citometría de flujo por fluorescencia en un sistema hematológico automatizado Sysmex XE-2100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

2. Óxido nítrico

El NO se determinó en suero mediante un ensayo colorimétrico semiautomatizado en un sistema de análisis robotizado Brio. La determinación de NO se basa en la detección colorimétrica de los metabolitos del óxido nítrico (nitritos y nitratos), que constituyen un marcador de la cantidad de NO vertida a la sangre. La corta vida media y el rápido metabolismo del NO en la circulación, hace que sea muy difícil medir directamente el NO y la actividad enzimática de la eNOS solo puede determinarse en tejido y células, por lo que se ha generalizado la determinación de nitrato y nitrito como marcadores indirectos de la biodisponibilidad de NO, principalmente debido a su estabilidad química y vida media relativamente larga. Los resultados de NO se expresan como concentración de nitratos y nitritos (NO_x , $\mu\text{mol/L}$).

Las muestras son ultrafiltradas previamente al análisis. Para ello se mezclan 200 μL de suero y 200 μL de tampón fosfato de potasio en un ultrafiltro Microcon Ultracel YM-10 con un límite de peso molecular nominal de 10000 kDa (Millipore, Bedford, USA) y se centrifugan a 2-8°C durante 45 min (13000g). El nitrato presente en el ultrafiltrado libre de proteínas se reduce a nitrito mediante la reacción enzimática de la nitrato reductasa en presencia de NADPH. En un segundo paso el nitrito total reacciona con sulfanilamida y N-(1-naftil)etilendiamina para formar un compuesto coloreado que absorbe a 550 nm. Debido a que este método no está totalmente automatizado, las determinaciones se realizaron por duplicado para garantizar la exactitud de los resultados. Los datos de precisión intraensayo e interensayo proporcionados por la casa comercial son $\leq 10\%$ y $\leq 20\%$, respectivamente.

3. Homocisteína

A partir del método descrito por Pfeiffer *et al.*^{301,302}, se desarrollaron dos procedimientos cromatográficos diferentes para la determinación de tHcy y de rHcy en plasma, basados en una separación isocrática en fase reversa con detección fluorescente de los metabolitos derivatizados previamente empleando SBDF.

1.1. Preparación de disoluciones tampón y reactivos generales

El método requiere la preparación previa de las siguientes disoluciones:

- NaOH 0,5 M.
- EDTA 1 mM.
- Tampón fosfato salino (PBS): fosfato 0,01 M; cloruro sódico 0,138 M; pH 7,4.
- Tampón borato: borato 0,2 M; EDTA 4 mM; pH 10.
- Disolución de derivatización: SBDF 1 g/L en el tampón borato.

- Disolución reductora: TCEP 120 g/L en la disolución tampón fosfato salino PBS.
- Disolución para la precipitación de las proteínas: ácido tricloroacético 100g/L y EDTA 1 mM.
- Disoluciones estándar: 2500 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína y 1250 $\mu\text{mol/L}$ de cisteamina en tampón fosfato salino, PBS.

1.2. Preparación de las disoluciones estándar y estándar interno

Todas las disoluciones estándar tras ser preparadas se conservaron en alícuotas de 1 mL, congeladas a -20°C . Se realizó un estudio de estabilidad de las disoluciones estándar, del que se obtuvo como resultado una estabilidad de al menos un año en estas condiciones.

a) Homocisteína total

La disolución empleada como estándar se preparó diluyendo 200 μL de disolución 2500 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína en 10 mL de PBS, obteniendo una concentración final 50 $\mu\text{mol/L}$.

b) Homocisteína reducida

Para asegurar el estado reducido de la homocisteína se realizó una reducción previa del estándar de tHcy, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente, 50 μL del estándar de tHcy con 2 mg de TCEP y tras una dilución con 950 μL de PBS, se obtuvo un estándar 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de rHcy.

b) Estándar interno

La concentración final del estándar interno de cisteamina fue de 50 $\mu\text{mol/L}$, y se preparó por dilución 1:25 en PBS, a partir de una disolución 1250 $\mu\text{mol/L}$ de cisteamina.

1.3. Preparación de las muestras

El esquema seguido para la determinación de la tHcy se muestra en la Imagen 16 y consta de los siguientes pasos:

1. *Reducción* de homocisteína a su forma reducida con TCEP.
2. *Precipitación* y eliminación de las proteínas con ácido tricloroacético.
3. *Derivatización* de la rHcy con SBDF.

Para la determinación de la concentración de la rHcy, el procedimiento es el siguiente:

1. *Derivatización* de la rHcy presente en la muestra con SBDF.
2. *Precipitación* y eliminación de las proteínas con ácido tricloroacético.

a) Homocisteína total

A 90 μL de plasma o disolución estándar se añaden 30 μL de disolución de estándar interno y 15 μL de disolución reductora. Se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se añaden 75 μL de la disolución para precipitación de proteínas. Se agita, se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifuga (13000 g, 5 minutos).

Sobre 20 μL de NaOH 0,5 M se añaden 50 μL del sobrenadante obtenido anteriormente, 80 μL de tampón borato y 50 μL de SBDF 1 g/L. Se agita, se incuba a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos y se introduce en un vial cromatográfico.

b) Homocisteína reducida

Se derivatizan 150 μL de plasma o disolución estándar, añadiendo 20 μL de NaOH 0,5 M, 80 μL de tampón borato y 50 μL de la disolución de derivatización. Se agita y se incuba a 60 $^{\circ}\text{C}$.

Transcurridos 60 minutos, se añaden 125 μL de disolución para precipitación de proteínas. Se agita y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga (13000 g, 5 minutos) y el sobrenadante obtenido se introduce en un vial cromatográfico.

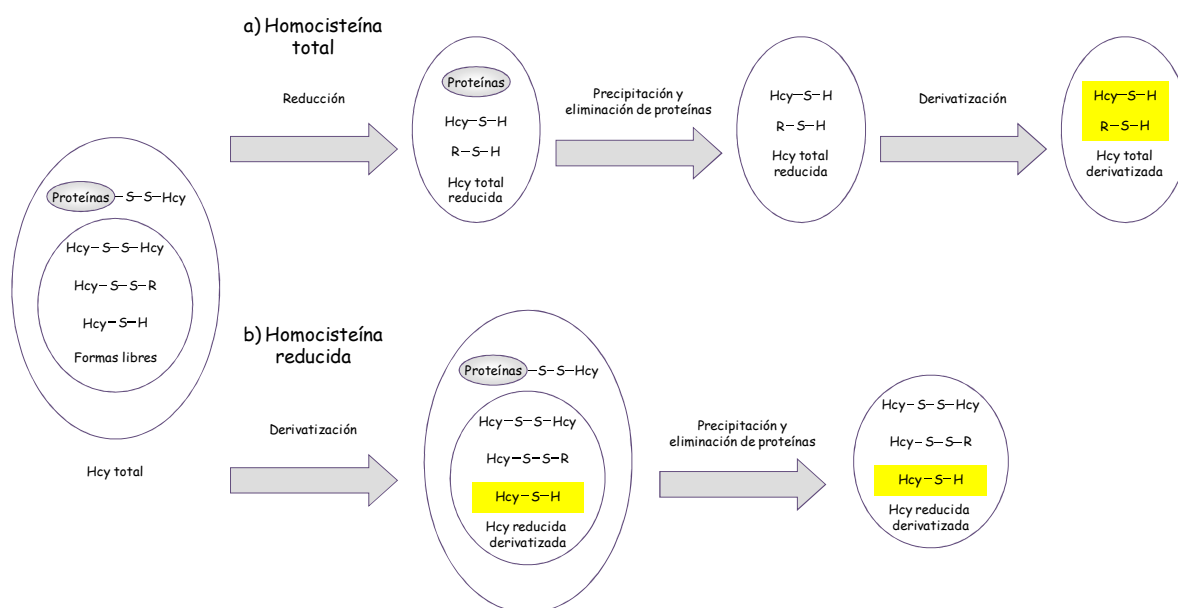


Imagen 16. Esquema general de la determinación de: a) homocisteína total (tHcy) y b) homocisteína reducida (rHcy).

2.4. Separación cromatográfica

Se puso a punto un método isocrático con tampón acetato 0,1 M; pH 5,0 y metanol al 4% a un flujo constante de 1 mL/min, a temperatura ambiente. La fase móvil se filtra previamente con una membrana de 0,22 $\mu\text{mol/L}$ (Millipore, Bedford, USA). Se inyecta un volumen de muestra derivatizada de 10 μL y la separación se monitoriza mediante detección fluorescente a una longitud de onda de excitación de 385 nm y de emisión de 515 nm (Imagen 17 e Imagen 18).

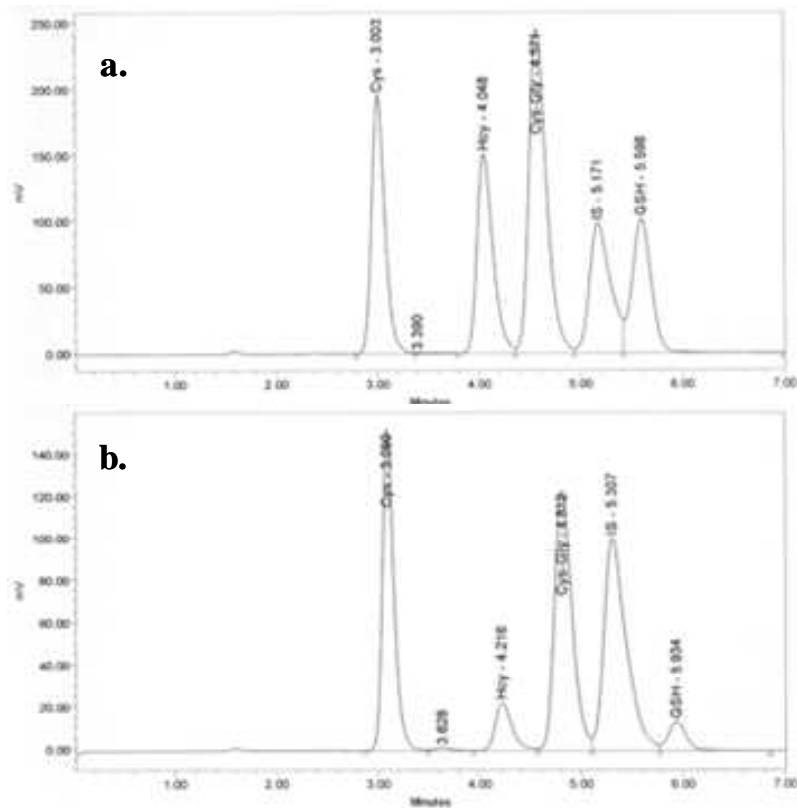


Imagen 17. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de homocisteína total: (a) estándar de homocisteína (50 $\mu\text{mol/L}$) y estándar interno (50 $\mu\text{mol/L}$), (b) muestra de plasma de un deportista (5,81 $\mu\text{mol/L}$; $t_R=4,2$ min) y estándar interno (50 $\mu\text{mol/L}$; $t_R=5,3$ min). Cys: cisteína; Hcy: homocisteína; Cys-Gly: cisteinilglicina; IS: estándar interno; GSH: glutatión.

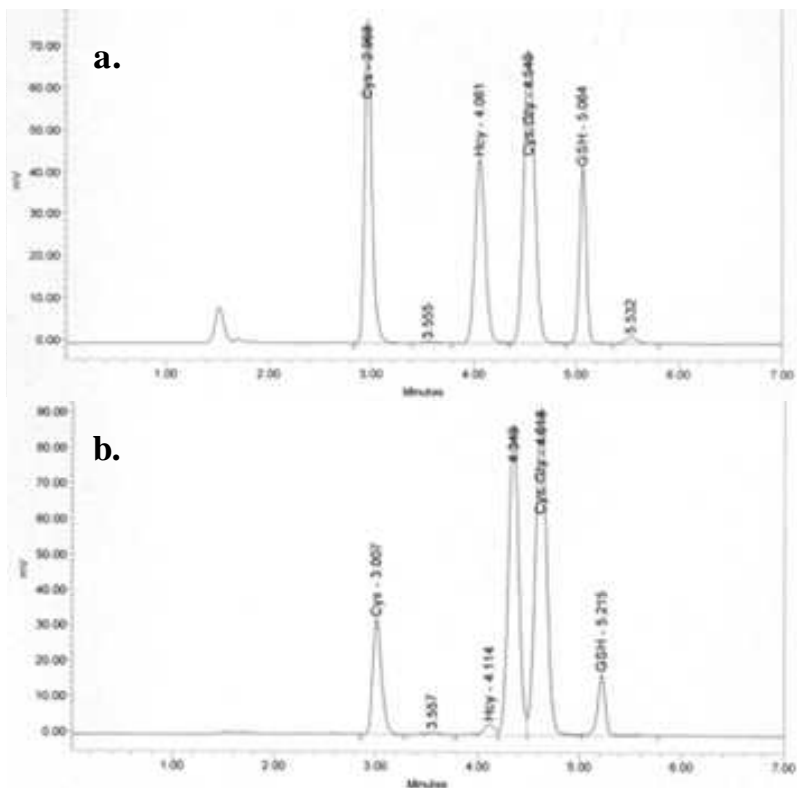


Imagen 18. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de homocisteína reducida: (a) estándar de homocisteína (2,5 $\mu\text{mol/L}$), (b) muestra de plasma de un deportista (0,18 $\mu\text{mol/L}$; $t_R=4,1$ min). Cys: cisteína; Hcy: homocisteína; Cys-Gly: cisteinilglicina; IS: estándar interno; GSH: glutatión.

4. Metilargininas

El procedimiento llevado a cabo para la determinación de ADMA, así como de SDMA y NMMA, se ha basado en el método descrito por Heresztyn *et al.*³⁰³ con modificaciones.

Para la determinación de estos compuestos, es necesario realizar una purificación previa de la muestra, mediante una extracción en fase sólida desarrollada a partir de propuestas previas^{304,305}, modificadas y optimizadas. Asimismo, se llevó a cabo la optimización de un método cromatográfico de separación en fase reversa, empleando como reactivo de derivatización AccQ, que permite la separación, detección fluorescente y cuantificación de estas magnitudes. Se utilizó como estándar interno N-propil arginina (N-PLA). El procedimiento empleado se describe a continuación.

3.1. Preparación de disoluciones tampón y reactivos generales

Es necesaria la preparación previa de las siguientes disoluciones:

- Ácido clorhídrico (HCl) 0,01M.
- Tampón fosfato salino, PBS: fosfato 0,01M; cloruro sódico 0,138M; pH 7,4.
- Disolución para elución desde los cartuchos de extracción: TEA al 3% en una disolución metanol:agua (65:35).
- Reactivo de derivatización: AccQ reconstituido con 1mL de acetonitrilo.
- Disoluciones estándar de ADMA, SDMA (2000 $\mu\text{mol/L}$) y NMMA (800 $\mu\text{mol/L}$), en ácido clorhídrico 0,01M. Se conservan en alícuotas de 1 mL a -20°C .
- Disolución estándar interno de N-PLA (400 $\mu\text{mol/L}$), preparada en agua destilada. Se conserva en alícuotas a -20°C .
- Eluyente: acetato sódico 0,1M pH 6,0.

3.2. Preparación de las disoluciones estándar y estándar interno

Se preparó una disolución estándar de trabajo, diluyendo las disoluciones estándar anteriormente mencionadas. Para ello se lleva a un volumen de 100 mL con PBS una mezcla de: 125 μL de disolución 2000 $\mu\text{mol/L}$ ADMA y SDMA, 125 μL de disolución 800 $\mu\text{mol/L}$ de NMMA. La disolución estándar de trabajo obtenida tenía las siguientes concentraciones: 2,5 $\mu\text{mol/L}$ ADMA y SDMA, 1 $\mu\text{mol/L}$ NMMA. Se prepararon alícuotas de 400 μL que se conservaron congeladas a -20°C .

El estándar interno se preparó diluyendo 250 μL de disolución 400 $\mu\text{mol/L}$ de N-PLA en PBS, llevando la disolución a un volumen de 10 mL en PBS, obteniéndose una disolución estándar interno de 10 $\mu\text{mol/L}$ de N-PLA que se conservó congelada en alícuotas de 200 μL a -20°C .

3.2. Preparación de las muestras

Se utilizaron cartuchos de extracción (MCX, Oasis) sin acondicionamiento previo y todos los pasos de lavado y elución se llevaron a cabo con bomba de vacío.

Una solución consistente en 200 μL de suero, 100 μL de estándar interno y 700 μL de PBS se hace pasar a través del cartucho y a continuación se realizan 2 lavados sucesivos con 1 mL de ácido clorhídrico 0,1M y 1 mL de metanol, respectivamente. La posterior elución de los analitos se lleva a cabo con 1 mL de la disolución de elución (TEA al 3% en una disolución metanol:agua 65:35) que se prepara diariamente. El eluato se seca a 60⁰C en corriente de aire (12 litros/min) en un evaporador, hasta obtener un extracto seco que se reconstituye con 100 μL de agua y se agita en un vortex hasta su total disolución. Se mezclan 50 μL de esta disolución con 50 μL del tampón borato suministrado con el kit comercial y 10 μL de reactivo de derivatización previamente reconstituido. Se agita durante 1 minuto y la mezcla de reacción se introduce directamente en los viales del inyector.

3.3. Separación cromatográfica

Utilizando una columna de fase reversa, se puso a punto un método de separación en gradiente a temperatura ambiente, a un flujo de 1mL/min de una fase móvil, previamente filtrada con una membrana de 0,22 $\mu\text{mol/L}$ (Millipore Bedford, USA), consistente en acetato sódico 0,1M pH 6,00 (eluyente A) y acetonitrilo 100% (eluyente B), según las proporciones que se muestran a continuación:

- 0-10 min: 94% de A y 6% de B.
- 10-21 min : 92% de A y 8% de B.
- 21-31 min: 74% de A y 26% de B.
- 31-38 min: 94% de A y 6% de B.

Se inyectan 20 μL de la mezcla de reacción anterior y la separación se monitoriza mediante detección fluorescente a una longitud de onda de excitación de 250 nm y de emisión de 395 nm.

5. Arginina y citrulina

El estudio de L-arginina y L-citrulina se incluye dentro del análisis completo de los aminoácidos libres plasmáticos, mediante HPLC en fase reversa en un cromatógrafo Breeze y según el procedimiento Pico Tag (Waters, Milford, MA, USA).

Brevemente, las muestras de plasma heparina se diluyen a partes iguales con un estándar interno de metionina sulfona en HCl 0,1M y la mezcla se desproteíniza mediante ultrafiltración a través de una membrana de celulosa regenerada (Microcon Ultracel YM-10) con límite de peso molecular 10.000, previamente acondicionada con HCl 0,1M.

Las muestras desproteinizadas y la disolución estándar de trabajo se liofilizan a sequedad y se derivatizan con PITC. La separación en la columna Pico-Tag se llevó a cabo mediante un gradiente binario de los eluyentes 1 y 2, a un flujo constante de 1 mL/min y a 46⁰C. La separación se monitoriza mediante detección espectrofotométrica a 254 nm.

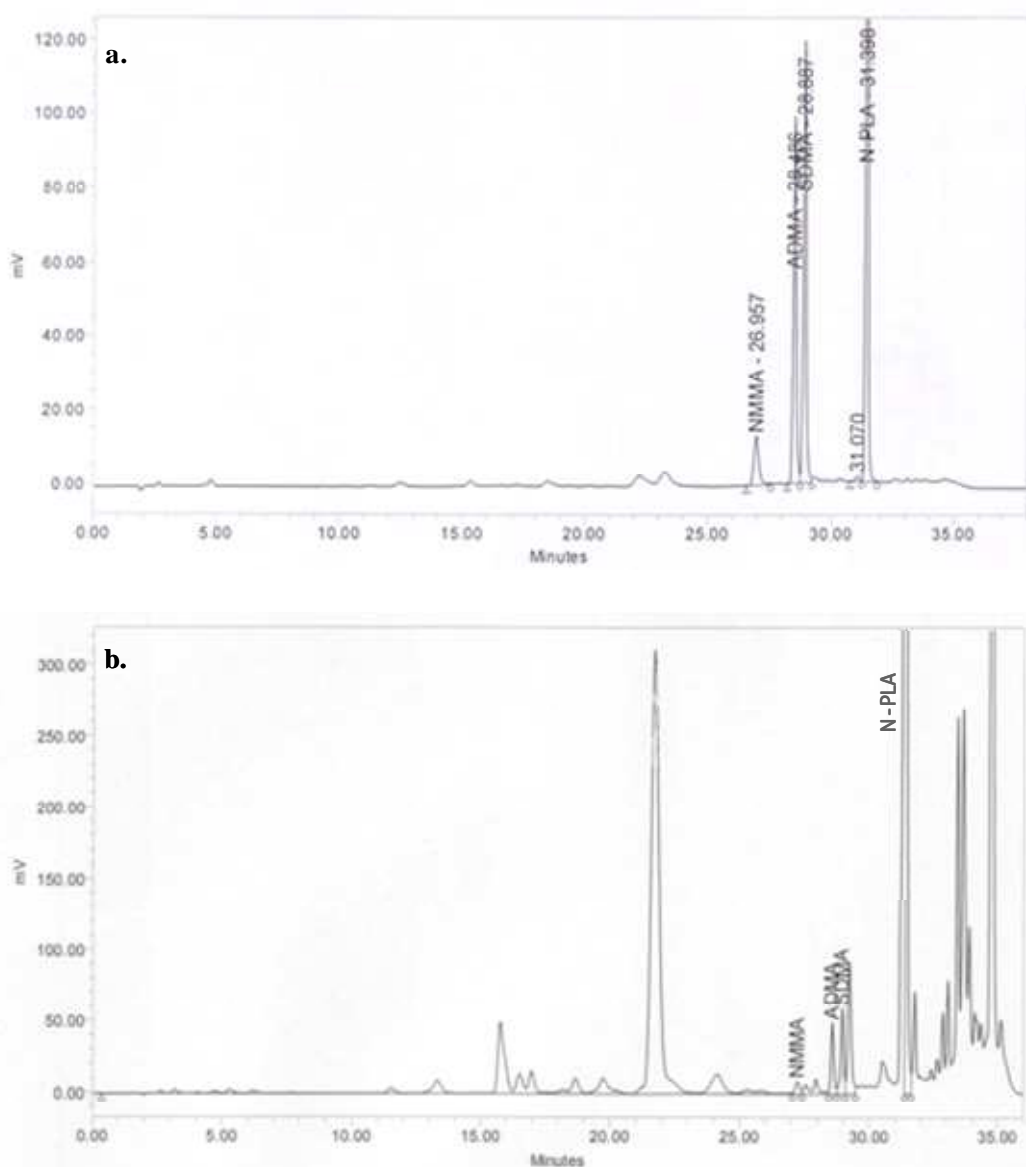


Imagen 19. Ejemplos de cromatogramas para la determinación de metilargininas: (a) estándar de NMMA (2 $\mu\text{mol/L}$), ADMA y SDMA (5 $\mu\text{mol/L}$), y estándar interno N-PLA (10 $\mu\text{mol/L}$), (b) muestra de suero: NMMA (0,228 $\mu\text{mol/L}$; t_R =27,2 min), ADMA (0,616 $\mu\text{mol/L}$; t_R =28,6 min), SDMA (0,544 $\mu\text{mol/L}$; t_R =29,0 min), estándar interno N-PLA (10 $\mu\text{mol/L}$; t_R =31,4 min). NMMA; monometilarginina, ADMA; dimetilarginina asimétrica, SDMA; dimetilarginina simétrica, N-PLA; N-propil arginina.

V. Validación analítica

La homocisteína y las metilargininas fueron analizadas por métodos adaptados y validados para este trabajo por lo que se describen a continuación, de forma detallada, tanto los procedimientos empleados para la validación como las características analíticas obtenidas.

1. Linealidad

Se realizaron diluciones de 8 alícuotas de un plasma por adición de volúmenes crecientes de una disolución en PBS de 500 $\mu\text{mol/L}$ de tHcy y 12,5 $\mu\text{mol/L}$ de rHcy. Se llevó a cabo el mismo estudio para las metilargininas, realizándose en este caso diluciones de 5 alícuotas de un suero por adición de volúmenes crecientes de una disolución en PBS de 10 $\mu\text{mol/L}$ de ADMA y SDMA o 4 $\mu\text{mol/L}$ de NMMA, respectivamente. Simultáneamente, se repitieron ambos estudios sustituyendo las muestras biológicas por tampón fosfato (PBS), con el fin de comprobar el paralelismo entre una matriz acuosa y una muestra real. Los resultados se muestran en la Imagen 20 y la Imagen 21.

La linealidad del método para la determinación de homocisteína, se verificó hasta 250 $\mu\text{mol/L}$ para la tHcy y hasta 6,25 $\mu\text{mol/L}$ para rHcy.

En el método para la determinación de metilargininas, la linealidad se verificó hasta 1 $\mu\text{mol/L}$ para el NMMA y hasta 2,5 $\mu\text{mol/L}$ para el ADMA y el SDMA.

Mediante un análisis de regresión lineal se evaluó la relación entre las áreas de los picos de las homocisteínas, o las alturas en las metilargininas, y las concentraciones.

Para la tHcy y rHcy, la comparación de las pendientes de las rectas obtenidas con la matriz acuosa y la matriz plasmática demostró un paralelismo aceptable entre la disolución acuosa y la muestra real, descartándose así un posible efecto matriz y haciendo posible el empleo de disoluciones estándar de trabajo acuosas. Sin embargo, no ocurría lo mismo con las metilargininas, por lo que en este caso se utilizó como estándar de trabajo una mezcla de muestras de suero (*pool*) suplementado con metilargininas por adición de un volumen de una solución estándar acuosa.

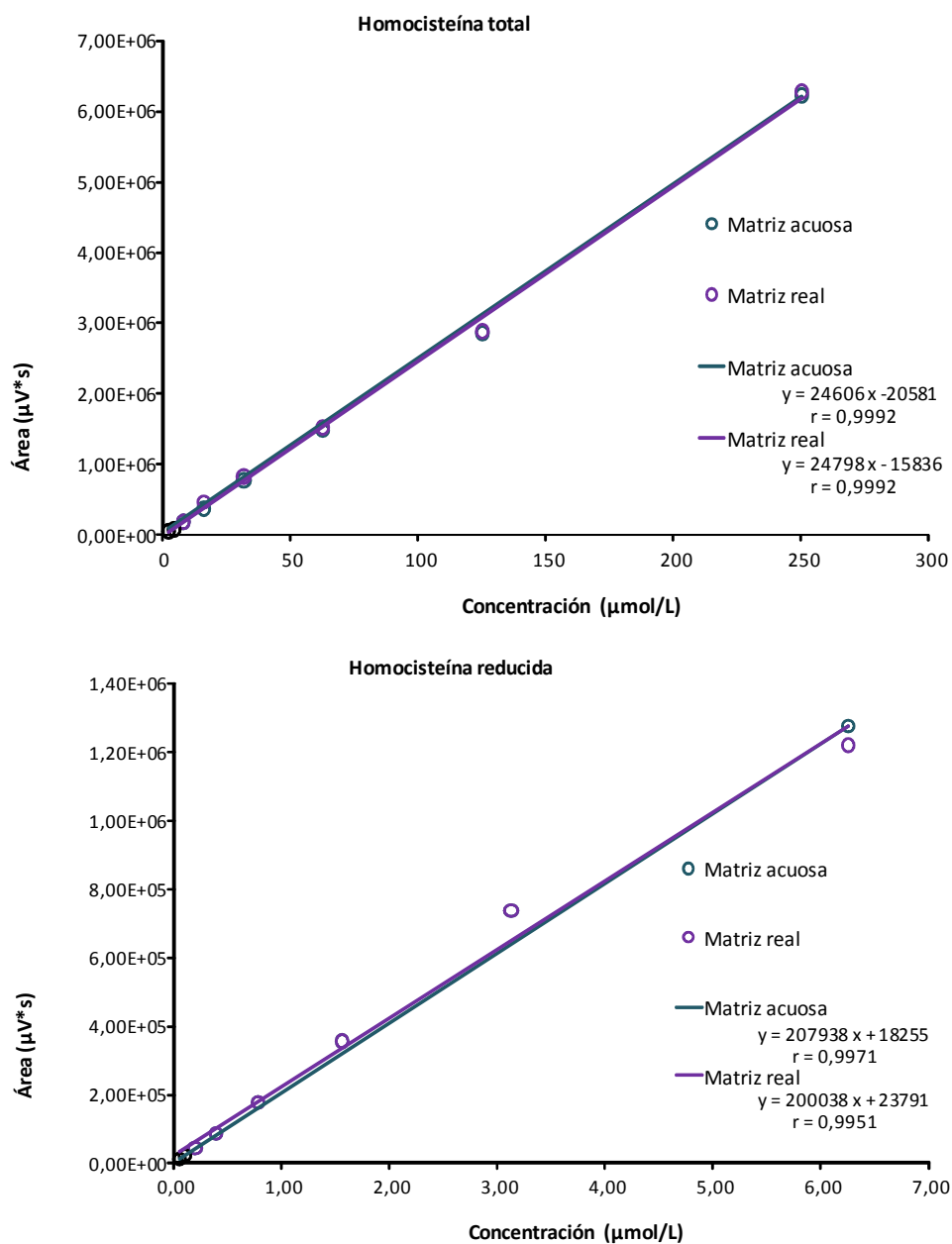


Imagen 20. Estudio de linealidad de la homocisteína en una matriz acuosa y en una matriz de muestra real. y: área del pico cromatográfico, x: concentración de homocisteína, r: coeficiente de regresión.

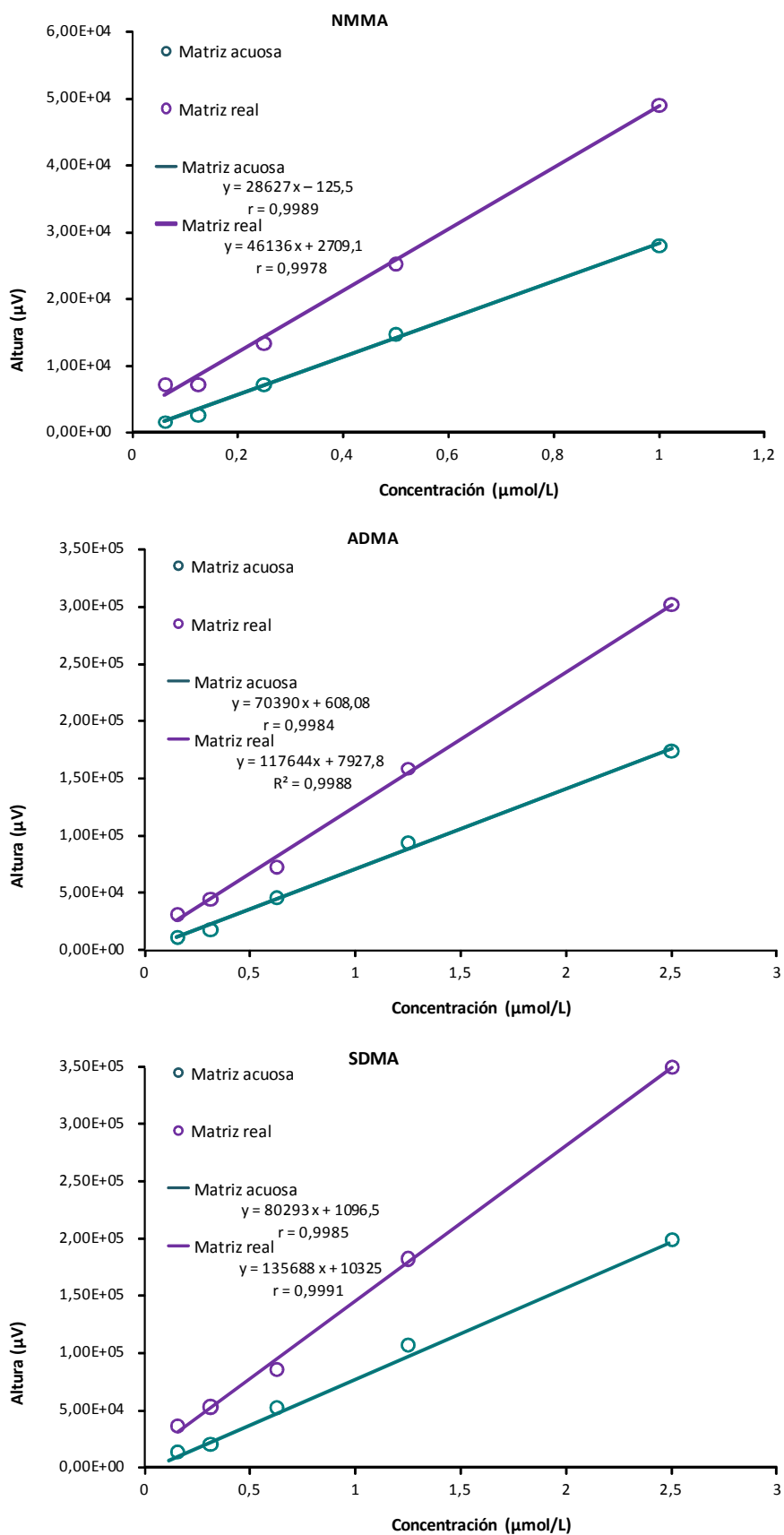


Imagen 21. Estudio de linealidad de las metilargininas en una matriz acuosa y en una matriz de muestra real. y: área del pico cromatográfico, x: concentración de homocisteína, r: coeficiente de regresión.

2. Sensibilidad

Para evaluar la sensibilidad se procesaron cinco blancos, consistentes en disoluciones de tampón fosfato. Se estableció el límite de detección como la cantidad que equivale a la media obtenida más 5 veces la desviación causada por el ruido de fondo del blanco.

Los límites de detección obtenidos para la determinación de la homocisteína fueron 0,47 $\mu\text{mol/L}$ para la tHcy y 0,007 $\mu\text{mol/L}$ para la rHcy.

El límite de detección obtenido para el NMMA fue 0,11 $\mu\text{mol/L}$ y para el ADMA y SDMA fue 0,03 $\mu\text{mol/L}$.

3. Precisión intraensayo e interensayo

Para la evaluación de la precisión intraensayo, se utilizaron dos *poles* de muestras para la tHcy y un único *pool* para la rHcy y los análogos de la arginina. Los *poles* se conservaron en alícuotas a -20°C hasta el momento del análisis. Se analizaron 13 alícuotas por duplicado. Cada pareja se procesó en diferentes días. La precisión intraensayo se calculó a partir de las diferencias entre los duplicados (D), como $\text{CV} (\%) = 100 \text{SD}/x$, donde $\text{SD} = (\sum D^2/2n)^{1/2}$ y x es la media de los primeros valores obtenidos de cada pareja³⁰⁶.

Precisión intraensayo					Precisión interensayo			
Determinación de homocisteína								
	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{intra} (%)	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{intra} (%)	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{inter} (%)	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{inter} (%)
tHcy	6,9	2,8	16,8	2,9	10,0	2,2	37,4	2,5
rHcy	0,24	4,1			0,24	16,0		
Determinación de metilargininas								
	Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{intra} (%)			Media ($\mu\text{mol/L}$)	CV_{inter} (%)		
NMMA	0,19	13,6			0,18	24,9		
ADMA	0,56	3,8			0,52	8,6		
SDMA	0,50	4,6			0,47	6,8		

Tabla 6. Precisión intra (CV_{intra}) e interensayo (CV_{inter}) de los métodos cromatográficos. tHcy y rHcy: homocisteína total y reducida; NMMA: monometilarginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica.

En el estudio de la precisión interensayo del método para la determinación de tHcy, se emplearon controles comerciales Liquichek Homocysteine Control (BioRad Laboratories), valorados a dos niveles de concentración. Para las metilargininas y para la rHcy se utilizaron los primeros valores obtenidos en cada pareja del estudio de la precisión intraensayo. Se evaluaron los resultados obtenidos en 13 y 10 series analíticas procesadas en diferentes días para las homocisteínas y metilargininas,

respectivamente. La precisión interensayo se calculó como el $CV(\%)=100 SD/x$, donde SD es la desviación estándar ($SD=\sqrt{\sum(x_i-x)^2/n}$) y x es la media de los resultados obtenidos.

En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de los *pooles* y controles comerciales, así como los coeficientes de variación obtenidos en la evaluación de la precisión intraensayo e interensayo.

4. Recuperación

Para realizar el estudio de recuperación, se añadió un volumen de una solución en PBS de concentración conocida a un volumen de *pool* de suero o plasma, según la magnitud a estudio. Las concentraciones se analizaron por quintuplicado, tanto en el *pool* como en la muestra enriquecida. Los resultados del estudio de recuperación se muestran en la Tabla 7.

	Concentración muestra	Concentración añadida	Concentración total	Recuperación (%)
Determinación de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)				
tHcy	7,77 \pm 0,30	9,89 \pm 0,13	17,92 \pm 0,54	102,6
rHcy	0,58 \pm 0,01	3,77 \pm 0,07	4,33 \pm 0,08	96,2
Determinación de metilargininas ($\mu\text{mol/L}$)				
NMMA	0,146 \pm 0,033	0,230 \pm 0,023	0,351 \pm 0,025	89,2
ADMA	0,462 \pm 0,011	0,685 \pm 0,039	1,092 \pm 0,039	92,0
SDMA	0,470 \pm 0,047	0,663 \pm 0,032	1,062 \pm 0,091	89,2

Tabla 7. Recuperación (%) obtenida como: (concentración total - concentración muestra)/concentración añadida. Valores expresados como media \pm SD de los replicados (n=5). tHcy y rHcy: homocisteína total y reducida; NMMA: monometilarginina; ADMA: dimetilarginina asimétrica; SDMA: dimetilarginina simétrica.

VI. Corrección de la hemoconcentración

Las concentraciones circulantes de los factores estudiados que se observan tras el ejercicio deben ser corregidas para compensar los cambios que ocurren en el volumen plasmático. Los cambios del volumen plasmático se calcularon a partir de los valores de hemoglobina y hematocrito, de acuerdo a las fórmulas de Dill y Costill³⁰⁷.

El porcentaje de cambio se puede obtener a partir de las fórmulas que figuran en la Tabla 8.

	Antes del ejercicio (pre)	Después del ejercicio (post)
Volumen de sangre	$VS_{pre} = 100\%$	$VS_{post} = VS_{pre} * \left(\frac{Hb_{pre}}{Hb_{post}} \right)$
Volumen de células	$VC_{pre} = VS_{pre} * \left(\frac{Hct_{pre}}{100} \right)$	$VC_{post} = VS_{post} * \left(\frac{Hct_{post}}{100} \right)$
Volumen de plasma	$VP_{pre} = VS_{pre} - VC_{pre}$	$VP_{post} = VS_{post} - VC_{post}$
Cambio en el volumen de sangre (%)	$\Delta VS (\%) = 100 * \frac{(VS_{post} - VS_{pre})}{VS_{pre}}$	
Cambio en el volumen de células (%)	$\Delta VC (\%) = 100 * \frac{(VC_{post} - VC_{pre})}{VC_{pre}}$	
Cambio en el volumen de plasma (%)	$\Delta VP (\%) = 100 * \frac{(VP_{post} - VP_{pre})}{VP_{pre}}$	

Tabla 8. Fórmulas para la valoración de los cambios de los volúmenes circulantes³⁰⁷. VS; volumen de sangre, VC; volumen de células; VP; volumen de plasma; Δ; cambio; Hb; hemoglobina, Hct; hematocrito.

De acuerdo a la siguiente fórmula, obtenida tras la sustitución y reordenación de los términos, es posible corregir la concentración o dilución del plasma tras la prueba de esfuerzo.

$$\Delta VP (\%) = 100 * \left[\frac{Hb_{pre}}{Hb_{post}} * \frac{(100 - Hct_{post})}{(100 - Hct_{pre})} - 1 \right]$$

Las concentraciones de las distintas magnitudes analizadas tras la realización de la prueba física fueron corregidas individualmente de acuerdo a esta fórmula para compensar las variaciones de volumen.

VII. Análisis estadístico de los datos

Las variables cuantitativas principales son las concentraciones de los distintos FRC estudiados, observadas antes y después de la realización de un esfuerzo físico agudo, así como la variación porcentual calculada tras el mismo. Como variables cualitativas se ha tenido cuenta el nivel de entrenamiento, menor a comienzos de temporada y mayor en época de competición y el tipo de ejercicio o deporte realizado.

La comprobación de la normalidad de las distribuciones de los datos se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad se comprobó mediante el test de Levene. Para la detección de valores atípicos o aberrantes se utilizó el método de Tukey³⁰⁶. Los valores atípicos o aberrantes de una distribución normal o de una distribución previamente transformada a normal, son aquellos valores mayores que $[P_{75}+1,5(P_{75}-P_{25})]$ o menores que $[P_{25}-1,5(P_{75}-P_{25})]$, donde P_{25} es el percentil 25 y P_{75} es el percentil 75.

Las variables cuantitativas con distribución normal se expresaron mediante la media \pm SEM (error estándar de la media, SD/\sqrt{n}). En las variables en las que la distribución no era normal, se emplearon como descriptivos la mediana y la amplitud intercuartílica.

Para evitar confusión con los términos empleados en la descripción de los resultados obtenidos se ha realizado la siguiente simplificación de denominaciones:

- efecto del ejercicio físico agudo \rightarrow ejercicio
- efecto del nivel de entrenamiento \rightarrow temporada
- efecto del tipo de ejercicio realizado \rightarrow deporte

Para evaluar el efecto del ejercicio agudo y la influencia del nivel de entrenamiento y del tipo de ejercicio se ha aplicado un Modelo Lineal General de medidas repetidas (ANOVA de tres factores con medidas repetidas). Las comparaciones a posteriori se llevaron a cabo mediante la prueba t de Student de datos apareados. De esta forma se calcularon cuatro estadísticos 3wF que responden a los siguientes planteamientos:

- Factor principal
 - Efecto del ejercicio agudo sobre el FRC estudiado (${}^3wF_{\text{ejercicio}}$).
- Interacciones entre los factores
 - Diferencias en el efecto del ejercicio agudo sobre el FRC según el nivel de entrenamiento (${}^3wF_{\text{ejercicio} \times \text{temporada}}$).
 - Diferencias en el efecto del ejercicio agudo sobre el FRC según el tipo de ejercicio (${}^3wF_{\text{ejercicio} \times \text{deporte}}$).

- El tipo de deporte modifica el efecto del entrenamiento sobre la variación de ese FRC con el ejercicio agudo (${}^3wF_{\text{ejercicio} \times \text{temporada} \times \text{deporte}}$).

Para evaluar el efecto del nivel de entrenamiento o del tipo de deporte en los valores pre-ejercicio, se llevó a cabo un Modelo Lineal General univariante (ANOVA de dos factores), que proporciona tres estadísticos 2wF que responden al planteamiento:

- Efecto del nivel de entrenamiento sobre las concentraciones pre-ejercicio (${}^2wF_{\text{temporada}}$).
- Efecto del tipo de deporte sobre las concentraciones pre-ejercicio (${}^2wF_{\text{deporte}}$).
- El tipo de deporte modifica el efecto del entrenamiento sobre las concentraciones pre-ejercicio (${}^2wF_{\text{temporada} \times \text{deporte}}$).

Para estudiar la asociación existente entre los distintos FRC estudiados, se realizaron análisis de correlación de acuerdo a la distribución de las variables implicadas; en distribución normal se calculó el coeficiente de correlación lineal de Pearson (r), en distribución no normal se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (rho).

En las pruebas estadísticas, se consideraron unos niveles de significación de $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$. El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.0 (SPSS Inc., Chicago, EEUU).

Resultados

I. Corrección de la hemoconcentración

En el ejercicio físico agudo se produce una deshidratación con la consecuente disminución del volumen de plasma. Secundariamente se produce una respuesta hipervolémica debida a la salida de agua intracelular, que puede observarse desde unos minutos a unas horas tras la finalización del ejercicio. Por tanto, las concentraciones de las distintas magnitudes bioquímicas tras la realización de la prueba física fueron corregidas individualmente de acuerdo a las fórmulas de Dill y Costill³⁰⁷, según su hemoconcentración o hemodilución. Para ello, se utilizaron los datos correspondientes a la concentración de hemoglobina y al hematocrito que permiten estimar el porcentaje del cambio en el volumen de plasma, sangre o células.

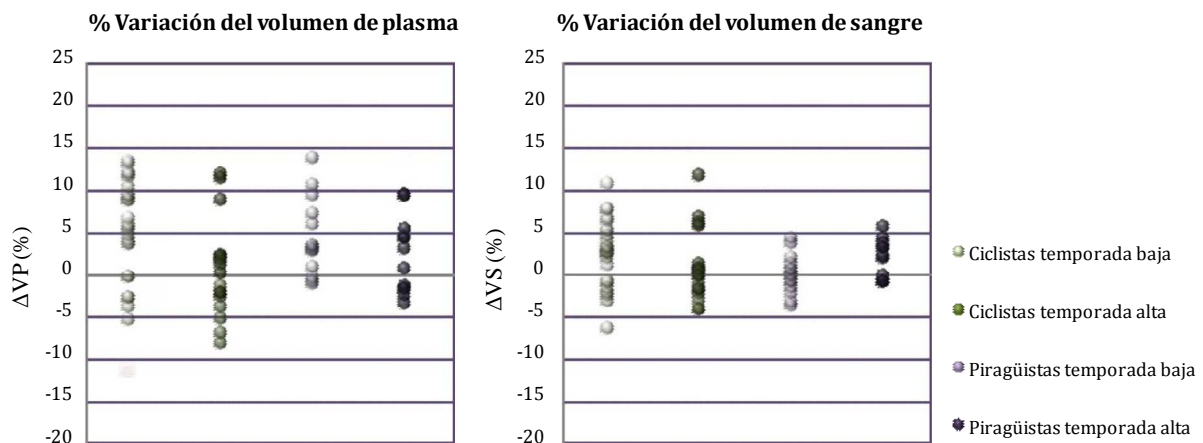


Imagen 22. Variación porcentual (%) de los volúmenes de plasma (ΔVP) y sangre (ΔVS), tras la prueba de esfuerzo.

A los 30 minutos tras la finalización del ejercicio se encontró un predominio de hemodilución en plasma. El 66,7% de los piragüistas y el 65,1% de los ciclistas presentaron hemodilución en ese momento. En la Imagen 22 se muestran las variaciones porcentuales de los volúmenes de plasma y sangre obtenidos para los deportistas a los 30 ± 5 minutos tras las distintas pruebas de esfuerzo realizadas a lo largo del periodo de estudio.

Los porcentajes de variación medios observados en el volumen de plasma son de un $3,70 \pm 7,05\%$ en los ciclistas y de un $2,76 \pm 5,97\%$ en los piragüistas. Las diferencias en los porcentajes de variación entre ambos grupos no son estadísticamente significativas (Imagen 23). El porcentaje de variación medio del volumen de plasma en las pruebas realizadas en temporada baja es de un $4,83 \pm 5,79\%$, mientras que en temporada alta fue significativamente menor ($1,68 \pm 7,31\%$; $p < 0,05$).

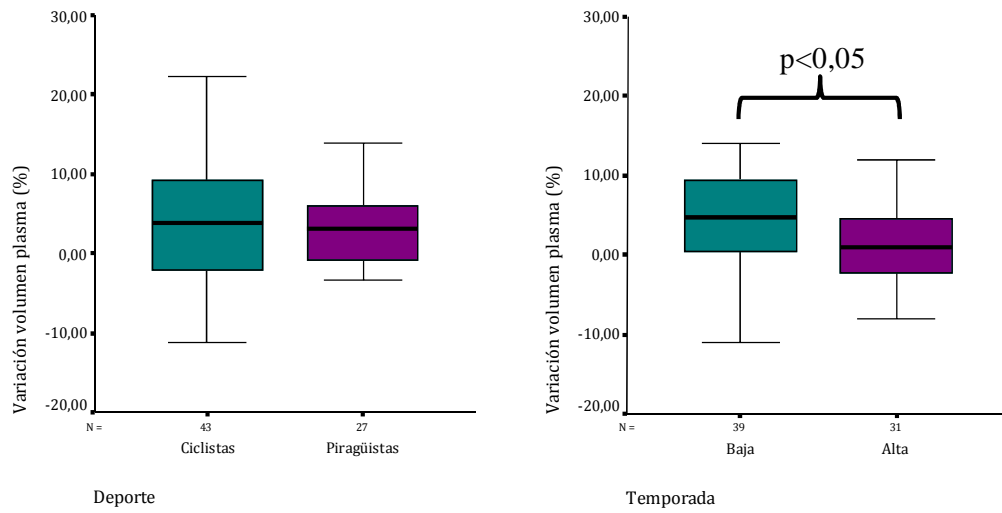


Imagen 23. Diagramas de caja que representan la variación de volumen de plasma con el ejercicio agudo, agrupados por deporte y temporada.

II. Parámetros bioquímicos generales

Con la finalidad de conocer los cambios producidos en el metabolismo de glúcidos y proteínas, así como, de la función renal, se examinaron las variaciones provocadas por el ejercicio agudo y por el entrenamiento en las concentraciones plasmáticas de las magnitudes bioquímicas relacionadas, las cuales se muestran a continuación (Tabla 9). Las alícuotas de suero correspondientes a 8 de los ciclistas en temporada alta resultaron insuficientes para realizar el análisis de las magnitudes correspondientes a este grupo.

		Ciclistas		Piragüistas	
		Temporada		Temporada	
		Baja	Alta	Baja	Alta
Glucosa^a (mg/dL)	Pre	81±1	71±1	85±1	80±2
	Post	96±5	75±5	97±4	86±5
	%	17,9±5,2	6,0±7,0	16,1±5,4	7,9±6,7
		n=15	n=10	n=14	n=13
Urea^a (mg/dL)	Pre	37±2	51±3	35±2	32±2
	Post	39±2	54±3	37±2	33±2
	%	5,0±2,7	7,7±6,2	5,0±2,6	6,6±3,6
		n=15	n=10	n=14	n=13
Creatinina^{a x b} (mg/dL)	Pre	1,01±0,02	1,06±0,02	0,99±0,03	1,04±0,03
	Post	1,24±0,02	1,20±0,05	1,22±0,05	1,18±0,03
	%	22,9±2,2	13,3±4,0	22,8±3,1	13,6±2,4
		n=15	n=10	n=14	n=13
Urato^a (mg/dL)	Pre	5,1±0,1	5,1±0,4	5,5±0,2	5,9±0,2
	Post	7,0±0,2	6,5±0,4	7,7±0,4	7,6±0,4
	%	37,7±3,4	28,1±5,9	39,9±5,0	30,3±6,4
		n=15	n=10	n=14	n=13
Proteínas^a totales (g/dL)	Pre	7,7±0,1	7,1±0,2	7,1±0,1	6,9±0,1
	Post	8,3±0,1	7,7±0,2	7,7±0,1	7,4±0,2
	%	7,8±1,0	6,3±1,2	8,7±1,0	7,3±1,4
		n=15	n=10	n=14	n=13
Albúmina^a (g/dL)	Pre	4,7±0,1	4,4±0,1	4,4±0,1	4,3±0,1
	Post	5,0±0,1	4,7±0,1	4,8±0,1	4,6±0,1
	%	7,5±1,1	6,8±1,8	8,2±1,2	5,8±1,5
		n=15	n=10	n=14	n=13

Tabla 9. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como media±SEM. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efectos significativos $p<0,05$ (ANOVA de 3 factores): (a) ejercicio y (a x b) interacción ejercicio x temporada.

De acuerdo a un ANOVA de 3 factores para el efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones, el ejercicio físico agudo produjo un incremento de los niveles medios de las magnitudes analizadas (Tabla 9). Este incremento fue independiente del deporte y del momento de la temporada,

salvo en el caso de la creatinina. En temporada baja el incremento medio de la creatinina fue mayor que en temporada alta (Imagen 24).

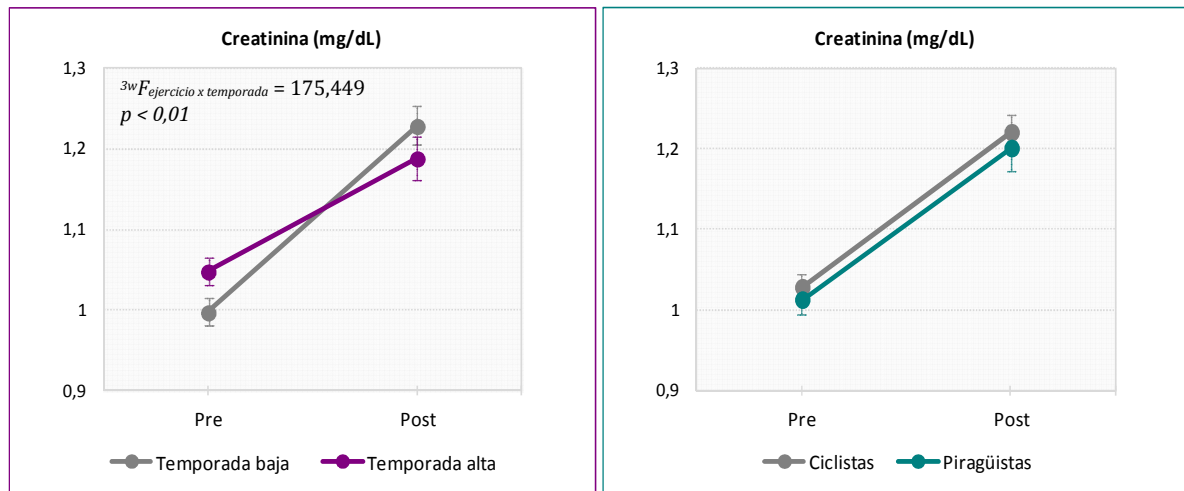


Imagen 24. Variaciones de la concentración media \pm SEM de creatinina con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=29, alta n=23) y el deporte (ciclistas n=25, piragüistas n=27). Efecto significativo (ANOVA de 3 factores) interacción ejercicio x temporada.

De acuerdo a un ANOVA de 2 factores para los efectos principales deporte y temporada (Imagen 25), en el momento de la temporada con un mayor nivel de entrenamiento, los deportistas muestran una disminución significativa de las concentraciones basales de glucosa (8,3%) proteínas totales (6,0%) y albúmina (4,4%). Por otra parte, los piragüistas mostraron concentraciones basales significativamente más elevadas de glucosa (6,9%) mientras que en los ciclistas se observaron concentraciones más elevadas de proteínas totales (6,1%) y de albúmina (3,8%). El entrenamiento y el tipo de deporte no ejercían ningún efecto significativo sobre las concentraciones pre-ejercicio de creatinina, urea y urato.

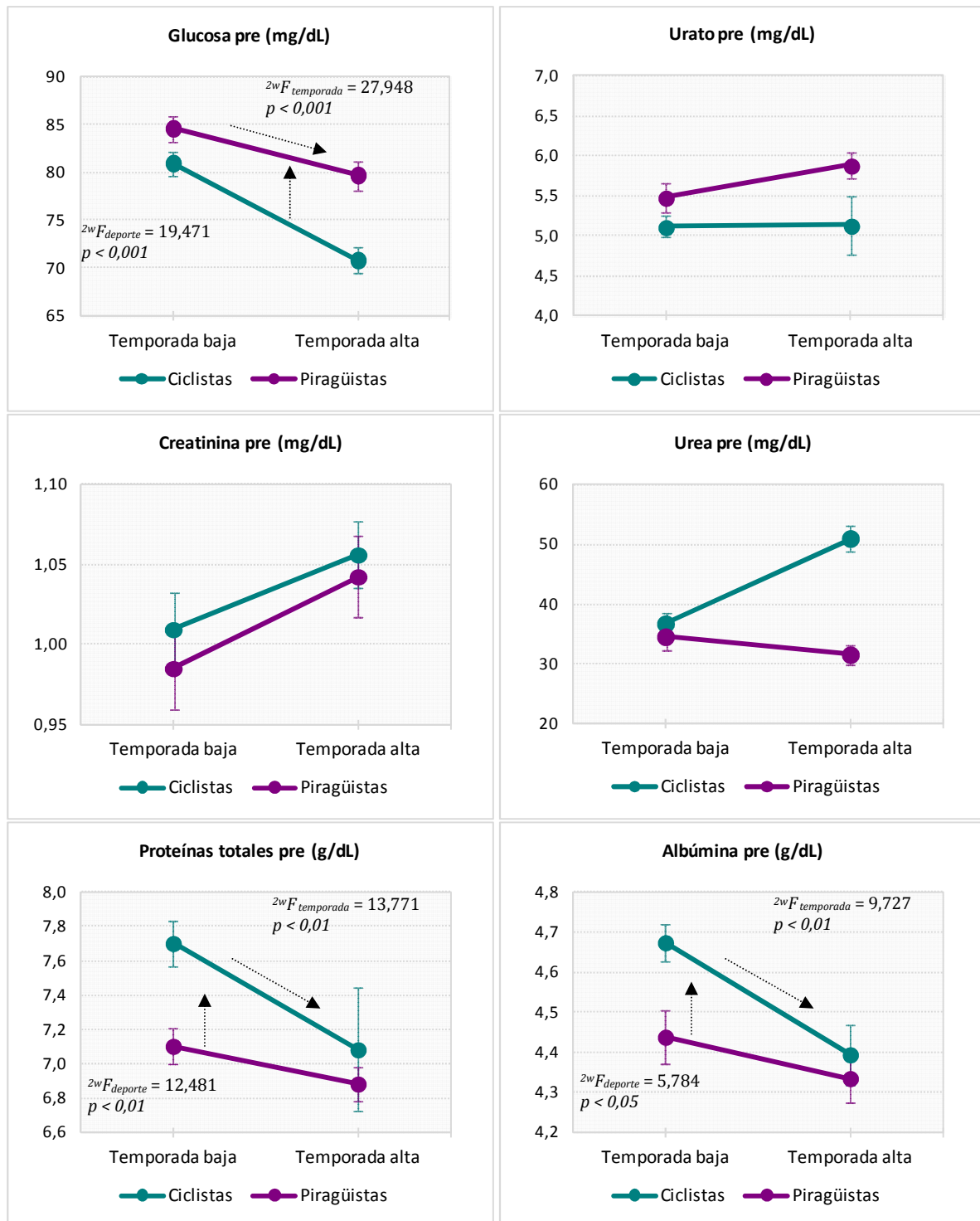


Imagen 25. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja (n=29) y alta (n=23), separados por deporte (ciclistas n=25; piragüistas n=27). Significación de la prueba ANOVA de 2 factores.

III. Marcadores bioquímicos de riesgo cardiovascular

1. Lípidos

Para valorar los cambios producidos en los marcadores metabólicos de tipo lipídico, se estudiaron las variaciones producidas por el ejercicio agudo y por el entrenamiento en las concentraciones séricas (Tabla 10). Las alícuotas de suero correspondientes a 8 de los ciclistas en temporada alta resultaron insuficientes para realizar el análisis de las apolipoproteínas y lp(a).

		Ciclistas		Piragüistas	
		Temporada		Temporada	
		Baja	Alta	Baja	Alta
Colesterol total^a (mg/dL)	Pre	170±6	148±4	158±8	146±12
	Post	181±6	156±4	164±8	155±12
	%	6,42±1,20	4,94±1,0	4,27±1,14	6,74±1,74
		n=15	n=18	n=14	n=13
cHDL^a (mg/dL)	Pre	69±3	64±2	60±4	51±2
	Post	72±3	68±2	63±4	54±3
	%	4,14±1,68	5,35±1,18	5,36±1,34	3,13±2,12
		n=15	n=18	n=14	n=13
cLDL (mg/dL)	Pre	85±6	72±5	85±6	72±6
	Post	87±7	73±5	84±6	72±5
	%	2,31±2,64	0,27±1,95	-0,65±1,95	-1,13±1,42
		n=15	n=18	n=14	n=13
ApoA^a (mg/dL)	Pre	171±6	163±7	159±7	143±5
	Post	206±7	197±6	183±7	164±5
	%	19,61±3,15	21,58±3,45	15,86±2,89	15,06±1,65
		n=15	n=10	n=14	n=13
ApoB^a (mg/dL)	Pre	56±3	46±3	60±5	48±3
	Post	65±4	55±5	68±6	51±3
	%	15,95±4,11	17,92±5,65	14,11±5,17	5,62±2,91
		n=15	n=10	n=14	n=13
Lp(a) (mg/dL)	Pre	19±5	17±5	33±12	32±12
	Post	18±4	17±5	30±12	30±12
	%	-5,21±7,72	2,44±8,33	-4,03±9,02	-6,76±8,18
		n=15	n=10	n=14	n=13
Triglicéridos^{a x c} (mg/dL)	Pre	66±10	57±3	52±7	67±9
	Post	83±11	76±12	76±11	110±16
	%	29,49±9,96	33,94±13,22	42,76±6,15	78,94±22,10
		n=15	n=18	n=14	n=13

Tabla 10. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como media±SEM. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efectos significativos $p<0,05$ (ANOVA de 3 factores): (a) ejercicio, (a x c) interacción ejercicio x deporte.

Según un ANOVA de 3 factores para el efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones, las concentraciones de colesterol total, cHDL, apoA y apoB se incrementaron con el ejercicio agudo. Este incremento fue independiente del deporte y del momento de la temporada. Las concentraciones de cLDL y lp(a) no se modificaban de forma significativa con el ejercicio agudo (Tabla 10).

La concentración de triglicéridos (Imagen 26) se incrementó con el ejercicio agudo de forma más acusada en los piragüistas que en los ciclistas.

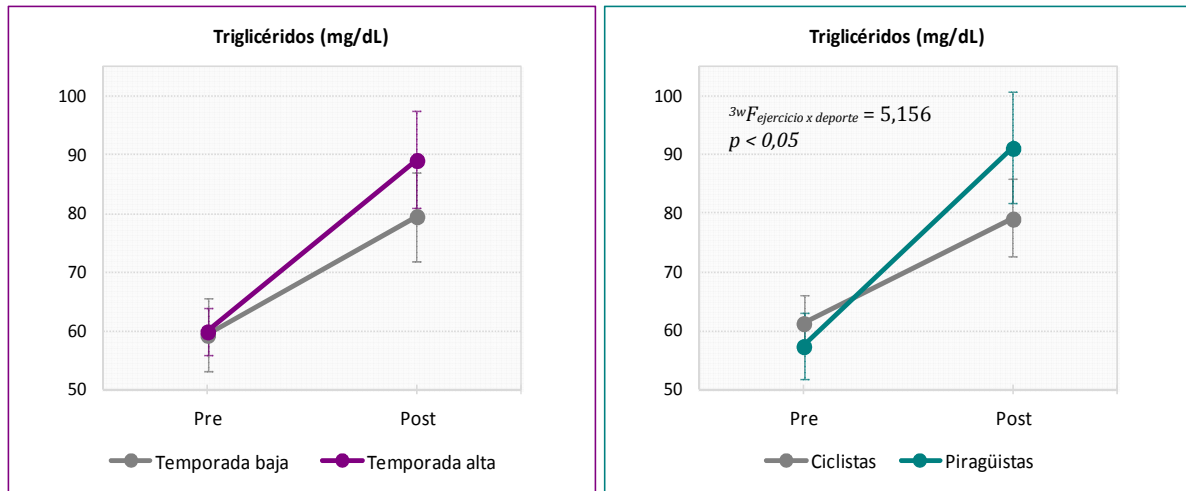


Imagen 26. Variaciones de la concentración media \pm SEM de triglicéridos con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja $n=29$, alta $n=31$) y el deporte (ciclistas $n=33$, piragüistas $n=27$). Efecto significativo (ANOVA de 3 factores) interacción ejercicio x deporte.

Según un ANOVA de 2 factores para los efectos principales deporte y temporada y su interacción (Imagen 27), en el momento de la temporada con mayor nivel de entrenamiento, los deportistas muestran una disminución significativa de las concentraciones basales de colesterol total (12,1%), cLDL (19,0%), y apoB (19,8%). Por otra parte, los ciclistas mostraron concentraciones basales significativamente más elevadas de cHDL (16,4%) y apoA (14,4%) que los piragüistas. El entrenamiento y el tipo de deporte no ejercían ningún efecto significativo sobre las concentraciones pre-ejercicio de lp(a) y triglicéridos.

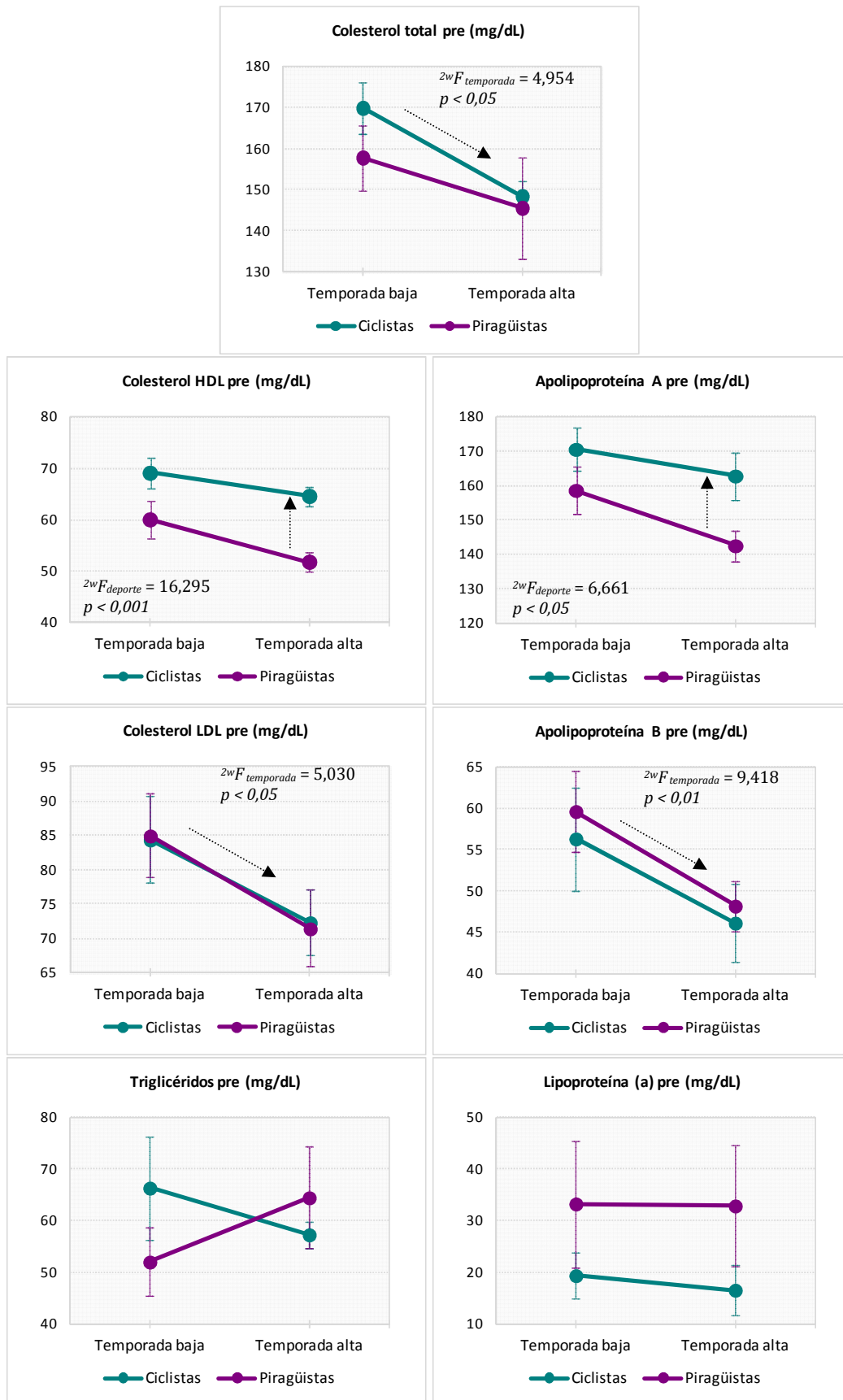


Imagen 27. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja (n=29) y alta (colesterol, cHDL, cLDL y triglicéridos n=31; apoA, apoB y lp(a) n=23), separados por deporte (ciclistas: colesterol, cHDL, cLDL y triglicéridos n=33; apoA, apoB y lp(a) n=25; piragüistas n=27). Significación de la prueba ANOVA de 2 factores.

2. Proteína C reactiva

Se ha valorado el efecto del ejercicio sobre un marcador de inflamación sistémica, como es la PCR ultrasensible. En los resultados obtenidos se observa que el ejercicio físico agudo produce una respuesta inflamatoria transitoria que el entrenamiento tiende a atenuar. A continuación se muestran los resultados obtenidos (Tabla 11).

		Ciclistas		Piragüistas	
		Temporada		Temporada	
		Baja (n=15)	Alta (n=17)	Baja (n=13)	Alta (n=13)
PCR ultrasensible (mg/L) ^{a x b}	Pre	0,82 ; 1,14	1,74 ; 1,66	0,33 ; 0,15	0,33 ; 0,57
	Post	0,90 ; 1,17	1,68 ; 1,72	0,36 ; 0,15	0,32 ; 0,46
	%	5,91±1,59	-3,17±2,97	7,38±2,76	-3,90±4,17

Tabla 11. PCR ultrasensible pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como mediana;amplitud intercuartílica o media±SEM. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efectos significativos (ANOVA de 3 vías): (a x b) interacción ejercicio x temporada.

La distribución de datos de las concentraciones de PCRus reflejaba un carácter exponencial por lo que se realizó una transformación logarítmica previa al ANOVA. Se excluyeron del análisis un resultado aberrante en los ciclistas en temporada alta y otro en los piragüistas en temporada baja. Dada la magnitud de los valores excluidos (22,67 mg/dL y 9,00 mg/dL, respectivamente) posiblemente esas elevadas concentraciones estuviesen relacionadas con algún proceso inflamatorio o infeccioso subyacente.

Del análisis del efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones mediante un ANOVA de 3 factores se deduce que el ejercicio físico agudo producía un incremento en la PCRus en el periodo de entrenamientos de baja intensidad, un efecto que desaparecía en el momento de la temporada de entrenamientos de elevada intensidad (Imagen 28). En temporada baja la PCRus se elevaba con el ejercicio agudo un 6,59±1,52%.

De acuerdo a un ANOVA de 2 factores para los efectos principales deporte y temporada, los ciclistas mostraban concentraciones basales de PCRus significativamente más elevadas que los piragüistas (Imagen 29) a lo largo de toda la temporada.

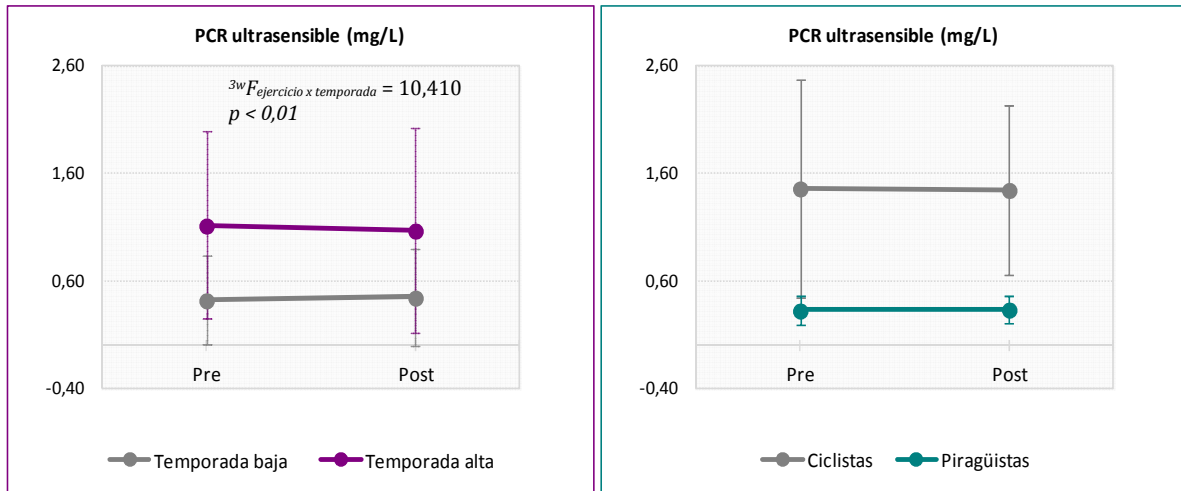


Imagen 28. Variaciones de la mediana y amplitud intercuartílica de proteína C reactiva ultrasensible con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=28, alta n=30) y el deporte (ciclistas n=32, piragüistas n=26). Efecto significativo (ANOVA de 3 factores) interacción ejercicio x temporada.

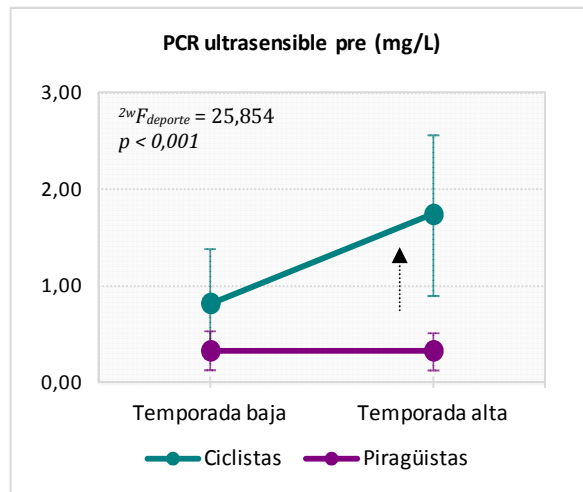


Imagen 29. Variaciones de las medianas y amplitud intercuartílica de las concentraciones de PCR ultrasensible antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja (n=28) y alta (n=30), separados por deporte (ciclistas n=32; piragüistas n=26). Significación de la prueba ANOVA de 2 factores.

3. Homocisteína

Se evaluó indirectamente el efecto producido por el ejercicio en los procesos relacionados con el estrés oxidativo a través de la homocisteína. Para ello, se estudiaron las modificaciones que se producen en el equilibrio redox de la homocisteína como consecuencia de la realización de ejercicio físico reflejadas en las concentraciones de las formas moleculares reducidas y oxidadas de la homocisteína plasmática.

		Ciclistas		Piragüistas	
		Temporada		Temporada	
		Baja	Alta	Baja	Alta
rHcy ^a ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	0,149 \pm 0,006	0,165 \pm 0,010	0,182 \pm 0,013	0,165 \pm 0,008
	Post	0,167 \pm 0,006	0,179 \pm 0,009	0,197 \pm 0,013	0,167 \pm 0,008
	%	12,23 \pm 2,27	9,2 \pm 4,65	8,87 \pm 2,35	2,67 \pm 4,17
		n=15	n=18	n=14	n=13
tHcy ^a ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	6,68 \pm 0,27	6,25 \pm 0,30	6,97 \pm 0,44	6,81 \pm 0,33
	Post	7,87 \pm 0,33	7,29 \pm 0,43	8,16 \pm 0,48	7,34 \pm 0,48
	%	18,19 \pm 2,45	16,41 \pm 3,38	17,19 \pm 1,74	7,00 \pm 3,03
		n=15	n=18	n=14	n=13
rHcy/tHcy ^a	Pre	0,023 ; 0,003	0,027 ; 0,009	0,028 ; 0,010	0,021 ; 0,008
	Post	0,021 ; 0,002	0,025 ; 0,006	0,026 ; 0,008	0,023 ; 0,007
	%	-4,61 \pm 2,43	-5,91 \pm 3,13	-7,05 \pm 1,65	-5,71 \pm 2,20
		n=15	n=18	n=14	n=13

Tabla 12. Homocisteína pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como mediana;amplitud intercuartílica o media \pm SEM. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efecto significativo $p < 0,05$ (ANOVA de 3 factores): (a) ejercicio. rHcy; homocisteína reducida, tHcy; homocisteína total, rHcy/tHcy; homocisteína reducida/total.

El análisis de los resultados mediante un ANOVA de 3 factores para el efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones (Tabla 12) muestra que el ejercicio físico agudo produjo un incremento de la concentración de homocisteína, tanto en su forma reducida como en su concentración total (Imagen 30). Para evaluar las modificaciones del equilibrio redox debidas al ejercicio físico se calcularon los ratios entre la concentración de las formas reducidas y la concentración total de homocisteína (rHcy/tHcy). El ejercicio agudo producía una disminución del ratio que era independiente del deporte y de la temporada (Tabla 12 e Imagen 30).

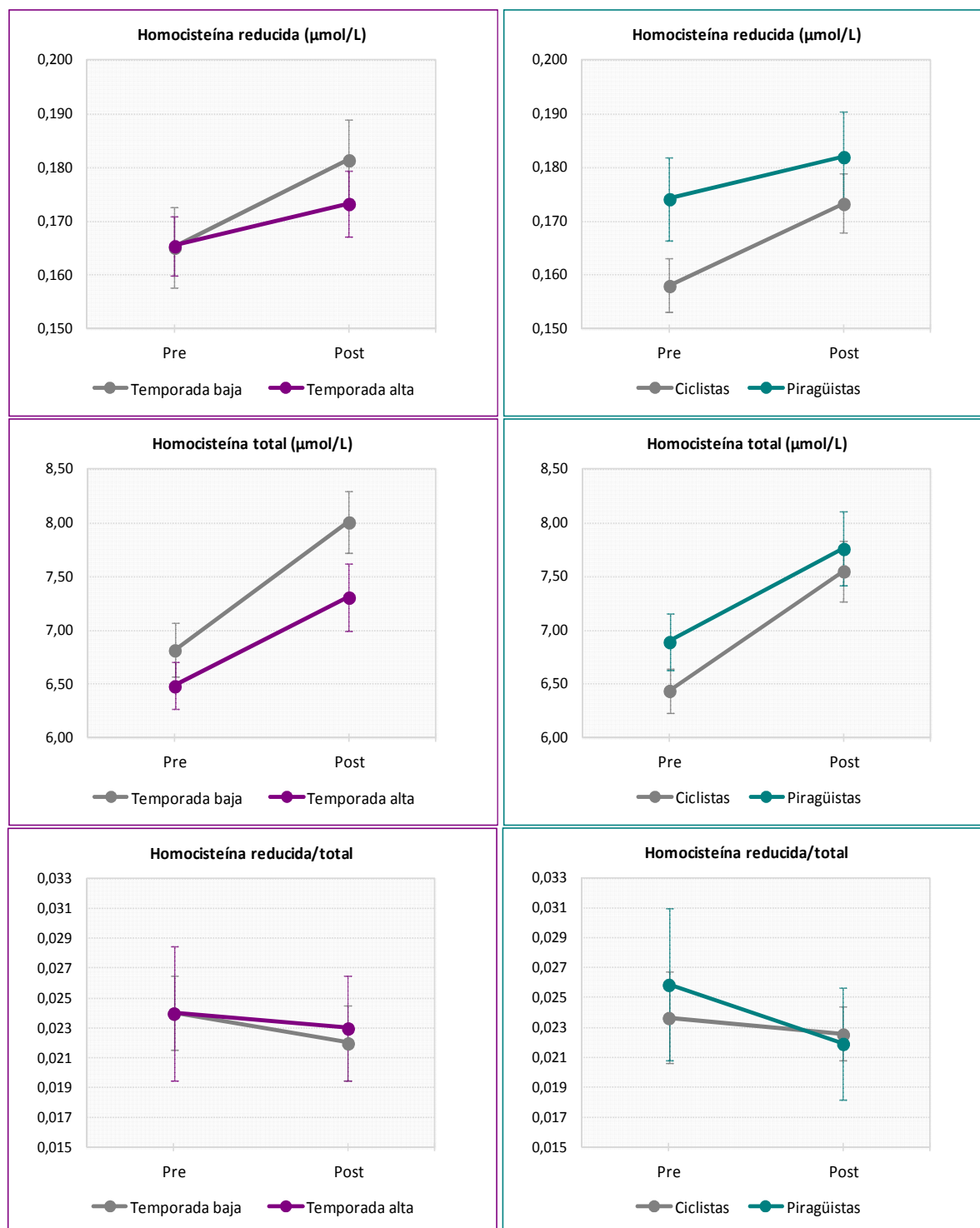


Imagen 30. Variaciones de la concentración media \pm SEM o mediana y amplitud intercuartílica de homocisteína con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=29, alta n=31) y el deporte (ciclistas n=33, piragüistas n=27).

Un ANOVA de 2 factores para los efectos principales deporte y temporada y su interacción, demostró que el entrenamiento y el tipo de deporte no ejercían efecto significativo sobre las concentraciones pre-ejercicio de rHcy, tHcy (Imagen 31). Sin embargo, mientras que el ratio rHcy/tHcy pre-ejercicio se eleva significativamente en los ciclistas en temporada alta, se reduce ligeramente en los piragüistas sin alcanzar significación estadística.

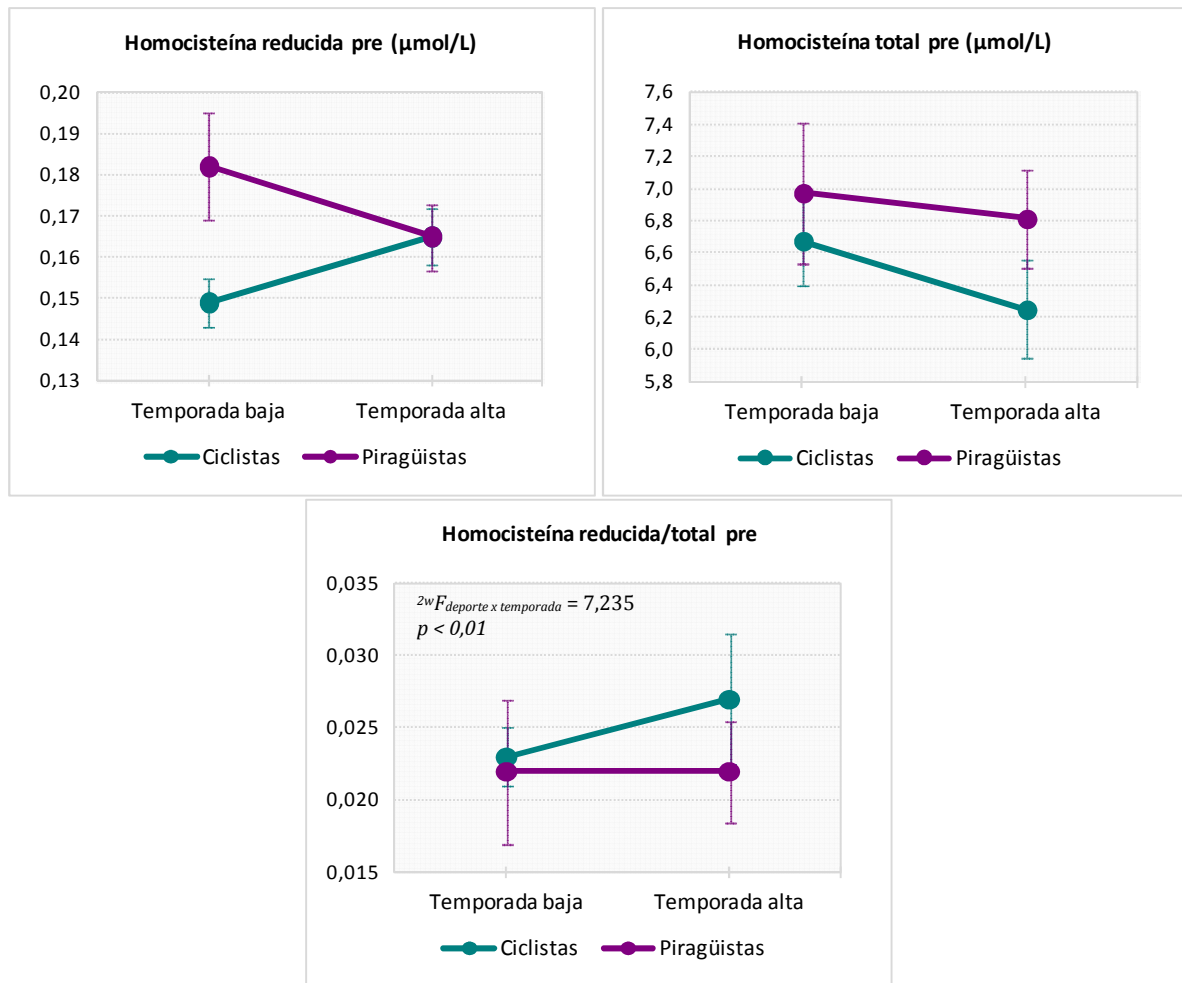


Imagen 31. Variaciones de las concentraciones medias \pm SEM de homocisteína y medianas y amplitud intercuartílica de homocisteína reducida/total, en temporada baja (n=29) y alta (n=31), separados por deporte (ciclistas n=33; piragüistas n=27). Significación de la prueba ANOVA de 2 factores.

4. Óxido nítrico

Se examinaron las variaciones provocadas por el ejercicio agudo y por el entrenamiento en las concentraciones circulantes de NO que reflejarán secundariamente los efectos en la función vasodilatadora endotelial, las cuales se muestran en la Tabla 13. Un ANOVA de 3 factores para el efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones, muestra que el ejercicio físico agudo producía un incremento de los niveles medios de NO_x y que este incremento era independiente del deporte y del momento de la temporada.

Cabe destacar que en los ciclistas este efecto parece más notable en temporada alta mientras que en los piragüistas se reduce considerablemente, sin embargo, estas diferencias no alcanza significación estadística (Imagen 32).

	Ciclistas				Piragüistas	
	Temporada		Temporada		Temporada	
	Baja (n=15)	Alta (n=18)	Baja (n=14)	Alta (n=13)	Baja (n=14)	Alta (n=13)
NO _x ^a	Pre	40,1±3,7	41,3±3,8	43,8±4,8	42,8±1,3	
(μmol/L)	Post	59,6±6,2	73,1±4,7	63,3±3,8	57,4±3,3	
	%	60,23±20,01	89,89±14,95	51,69±8,56	35,19±7,91	

Tabla 13. Óxido nítrico expresado como concentración de nitratos y nitritos (NO_x) pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como media±SEM. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efecto significativo p<0,05 (ANOVA de 3 factores): (a) ejercicio.

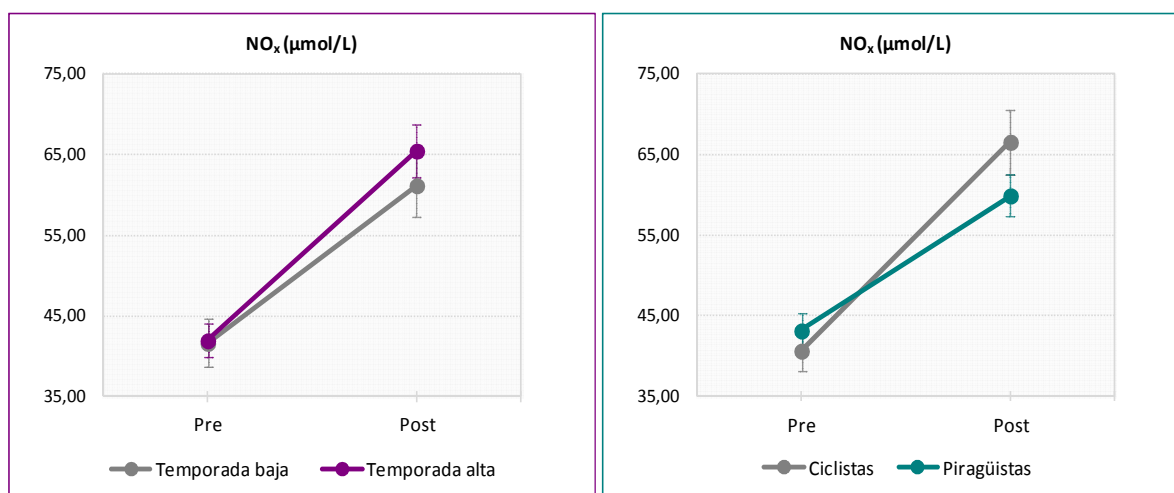


Imagen 32. Variaciones de la concentración media±SEM de óxido nítrico expresadas como nitratos y nitritos (NO_x) con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=29, alta n=31) y el deporte (ciclistas n=33, piragüistas n=27).

De acuerdo a un análisis mediante ANOVA de 2 factores para los efectos principales deporte y temporada y su interacción, el entrenamiento y el tipo de deporte no ejercían efecto significativo sobre las concentraciones pre-ejercicio de NO (Imagen 33).

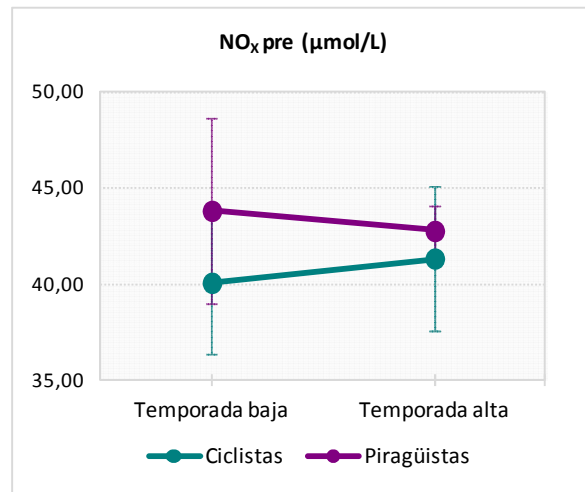


Imagen 33. Variaciones de las concentraciones medias \pm SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja (n=29) y alta (n=31), separados por deporte (ciclistas n=33; piragüistas n=27).

5. Metilargininas

Con el objetivo de conocer los cambios producidos en el metabolismo de las metilargininas, se estudiaron las variaciones provocadas por el ejercicio agudo y por el entrenamiento en las concentraciones plasmáticas del ADMA y de otras metilargininas, así como, de sus metabolitos relacionados y de los ratios arginina/ADMA y ADMA/SDMA, las cuales se muestran en la Tabla 14. Las alícuotas de suero correspondientes a 8 de los ciclistas en temporada alta resultaron insuficientes para realizar el análisis de los metabolitos de este grupo.

		Ciclistas		Piragüistas	
		Temporada		Temporada	
		Baja	Alta	Baja	Alta
L-arginina ^{a x c} ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	51,8 \pm 2,8	48,7 \pm 3,2	69,5 \pm 3,5	47,8 \pm 3,4
	Post	61,2 \pm 5,6	59,7 \pm 5,6	81,9 \pm 4,9	71,6 \pm 3,4
	%	19,78 ; 33,08	17,24 ; 55,58	14,63 ; 16,42	40,84 ; 60,75
		n=15	n=10	n=14	n=13
L-citrulina ^a ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	30,1 \pm 1,1	27,3 \pm 1,6	37,6 \pm 1,5	30,8 \pm 1,4
	Post	34,5 \pm 2,2	30,0 \pm 2,4	39,3 \pm 1,8	35,7 \pm 1,8
	%	12,08 ; 29,15	8,82 ; 15,75	3,51 ; 15,81	15,71 ; 23,77
		n=15	n=10	n=14	n=13
NMMA ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	0,184 \pm 0,022	0,185 \pm 0,007	0,155 \pm 0,019	0,173 \pm 0,010
	Post	0,204 \pm 0,025	0,192 \pm 0,010	0,166 \pm 0,013	0,192 \pm 0,012
	%	20,17 \pm 12,10	4,23 \pm 4,81	22,51 \pm 16,94	14,23 \pm 8,22
		n=15	n=10	n=14	n=13
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	0,553 \pm 0,026	0,514 \pm 0,019	0,573 \pm 0,025	0,468 \pm 0,018
	Post	0,573 \pm 0,026	0,540 \pm 0,035	0,597 \pm 0,020	0,485 \pm 0,022
	%	5,10 \pm 5,34	4,59 \pm 3,98	6,66 \pm 6,94	3,82 \pm 3,19
		n=15	n=10	n=14	n=13
SDMA ^a ($\mu\text{mol/L}$)	Pre	0,538 \pm 0,025	0,487 \pm 0,021	0,576 \pm 0,030	0,467 \pm 0,022
	Post	0,583 \pm 0,027	0,576 \pm 0,032	0,637 \pm 0,036	0,483 \pm 0,013
	%	10,76 \pm 5,71	18,12 \pm 3,52	12,49 \pm 7,20	6,96 \pm 4,62
		n=15	n=10	n=14	n=13
ADMA/SDMA ^a	Pre	1,038 \pm 0,043	1,059 \pm 0,022	1,008 \pm 0,042	1,018 \pm 0,041
	Post	0,989 \pm 0,031	0,937 \pm 0,027	0,955 \pm 0,043	1,001 \pm 0,037
	%	-0,05 \pm 0,02	-0,12 \pm 0,02	-0,04 \pm 0,04	-0,01 \pm 0,02
		n=15	n=10	n=14	n=13
Arginina/ADMA ^{a x c}	Pre	97,0 \pm 7,6	95,2 \pm 8,3	129,3 \pm 8,7	100,5 \pm 6,1
	Post	108,3 \pm 11,3	107,8 \pm 7,4	150,5 \pm 6,9	151,0 \pm 4,8
	%	14,65 \pm 8,10	16,15 \pm 7,93	21,63 \pm 9,11	55,79 \pm 9,26
		n=15	n=10	n=14	n=13

Tabla 14. Concentraciones pre y post-ejercicio agudo y porcentajes de variación. Datos expresados como media \pm SEM y mediana y amplitud intercuartílica. Niveles post-ejercicio corregidos para hemodilución-concentración. Efectos significativos $p < 0,05$ (ANOVA de 3 factores): (a) ejercicio, (a x c) interacción ejercicio x deporte. NMMA; monometilarginina, ADMA; dimetilarginina asimétrica, SDMA; dimetilarginina simétrica.

El estudio mediante un ANOVA de 3 factores del efecto principal del ejercicio y las posibles interacciones mostró que el ejercicio físico agudo producía un incremento de los niveles medios de L-arginina, L-citrulina, SDMA y arginina/ADMA y una disminución del ratio ADMA/SDMA. Estas variaciones fueron independientes del deporte y del momento de la temporada para L-citrulina, SDMA y el ADMA/SDMA, no así en la L-arginina y el ratio arginina/ADMA (Tabla 14, Imagen 34 e Imagen 35). En los piragüistas el incremento medio de los niveles de L-arginina ($35,3 \pm 6,4\%$) con el ejercicio agudo fue mayor significativamente que en los ciclistas ($19,6 \pm 6,0\%$). La misma tendencia se observó en el ratio arginina/ADMA, en el que se observa en los piragüistas una elevación significativamente mayor del cociente con el ejercicio agudo ($39,5 \pm 3\%$) que en los ciclistas ($14,2 \pm 5,7\%$). El ejercicio agudo no ejercía un efecto significativo sobre las concentraciones de ADMA y NMMA.

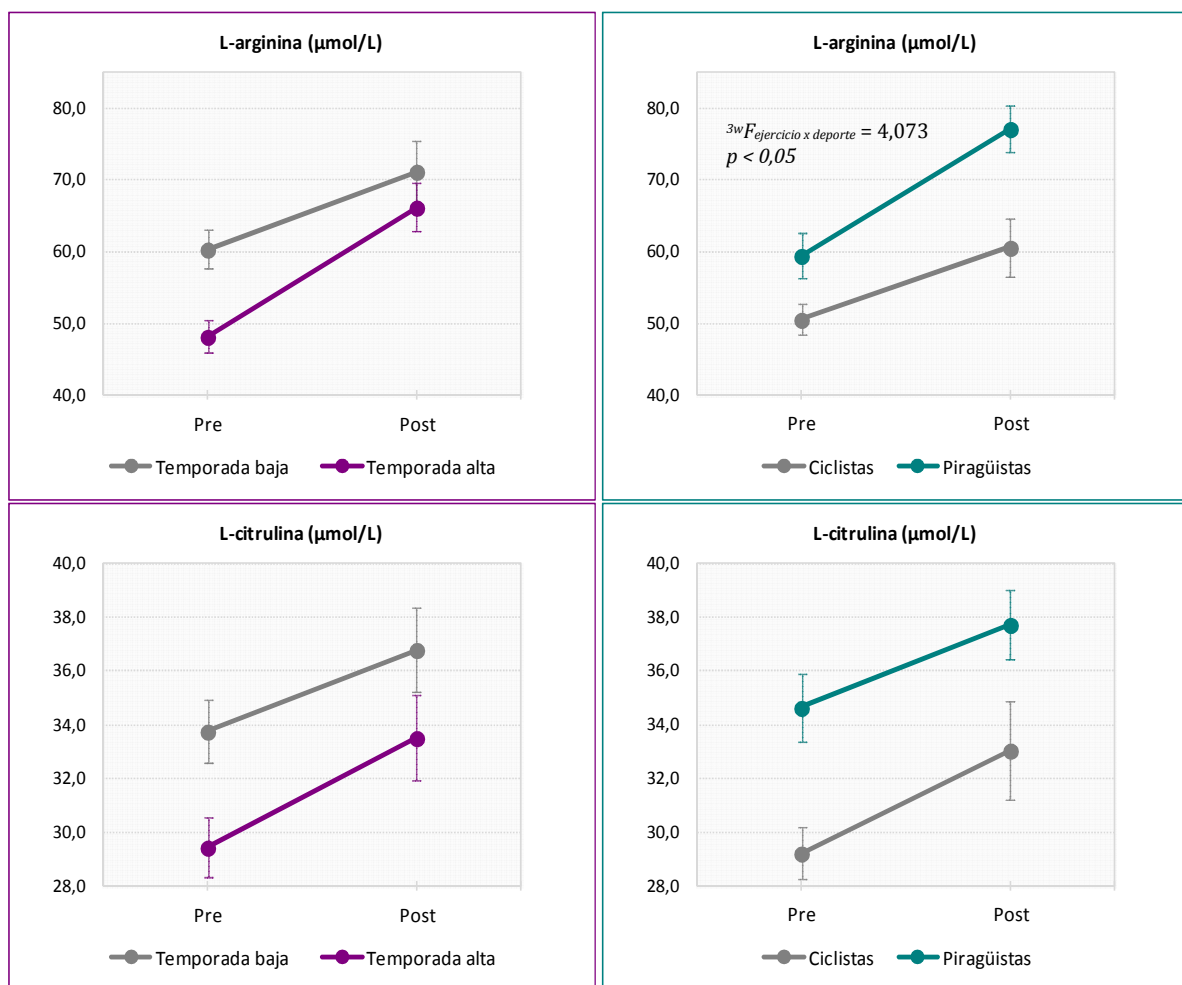


Imagen 34. Variaciones de la concentración media \pm SEM de L-arginina y L-citrulina con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=29, alta n=23) y el deporte (ciclistas n=25, piragüistas n=27). Efecto significativo (ANOVA de 3 factores) interacción ejercicio x deporte.

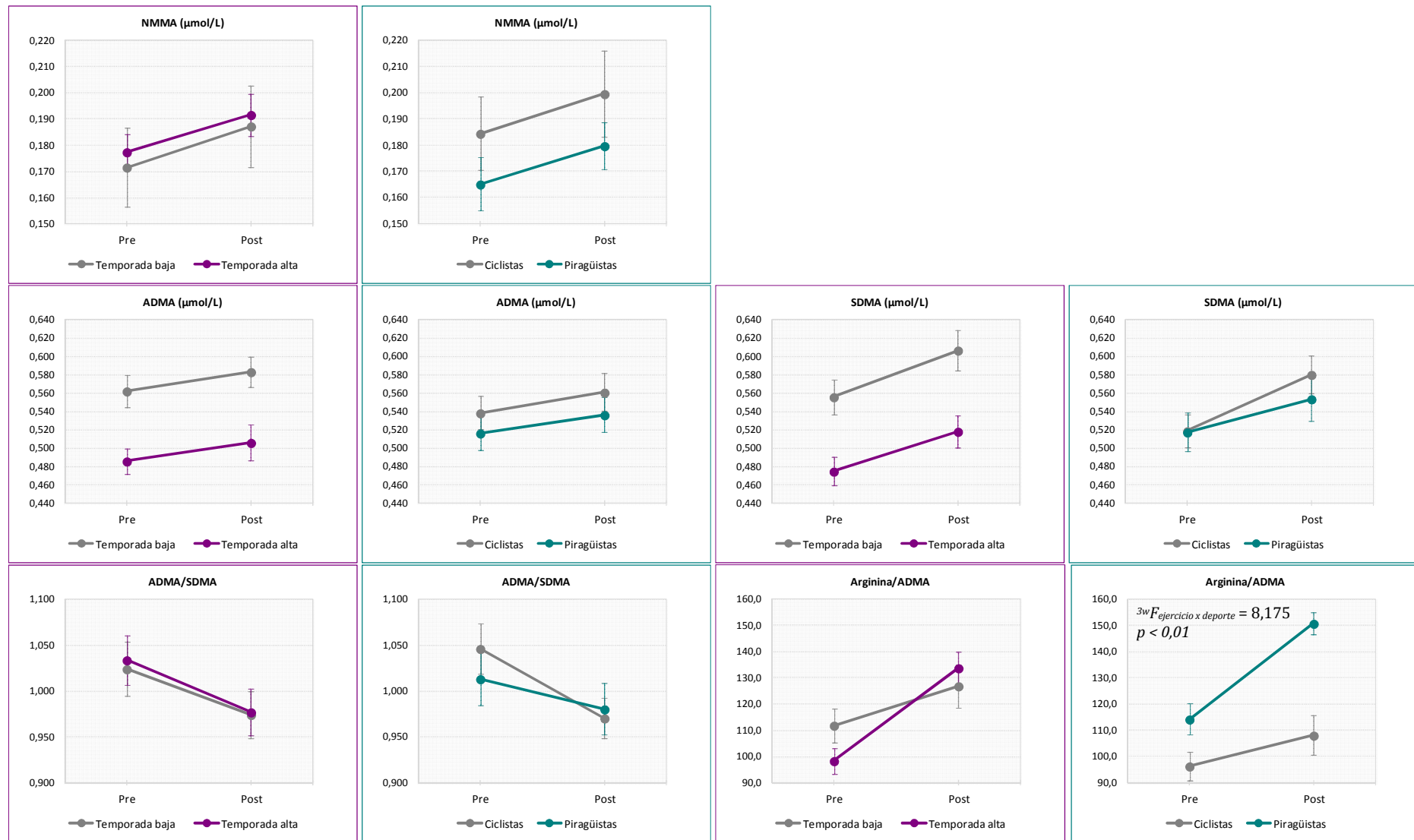


Imagen 35. Variaciones de la concentración media±SEM de metilargininas y ratios relacionados con el ejercicio agudo en función de la temporada de entrenamiento (baja n=29, alta n=23) y el deporte (ciclistas n=25, piragüistas n=27). Efecto significativo (ANOVA de 3 factores) interacción ejercicio x deporte.

Se examinaron mediante un ANOVA de 2 factores los efectos principales deporte y temporada y su interacción (Imagen 36). En el momento de la temporada con un mayor nivel de entrenamiento, los deportistas mostraban una disminución significativa de las concentraciones basales de L-arginina, L-citrulina, ADMA y SDMA y, en el caso de la L-arginina esta disminución era más acusada en los piragüistas que en los ciclistas. Por otra parte, los piragüistas mostraron concentraciones basales significativamente más elevadas de L-arginina, L-citrulina, así como, el ratio arginina/ADMA en los dos momentos de la temporada. El entrenamiento y el tipo de deporte no ejercían efectos significativos sobre las concentraciones pre-ejercicio de NMMA y el cociente ADMA/SDMA.

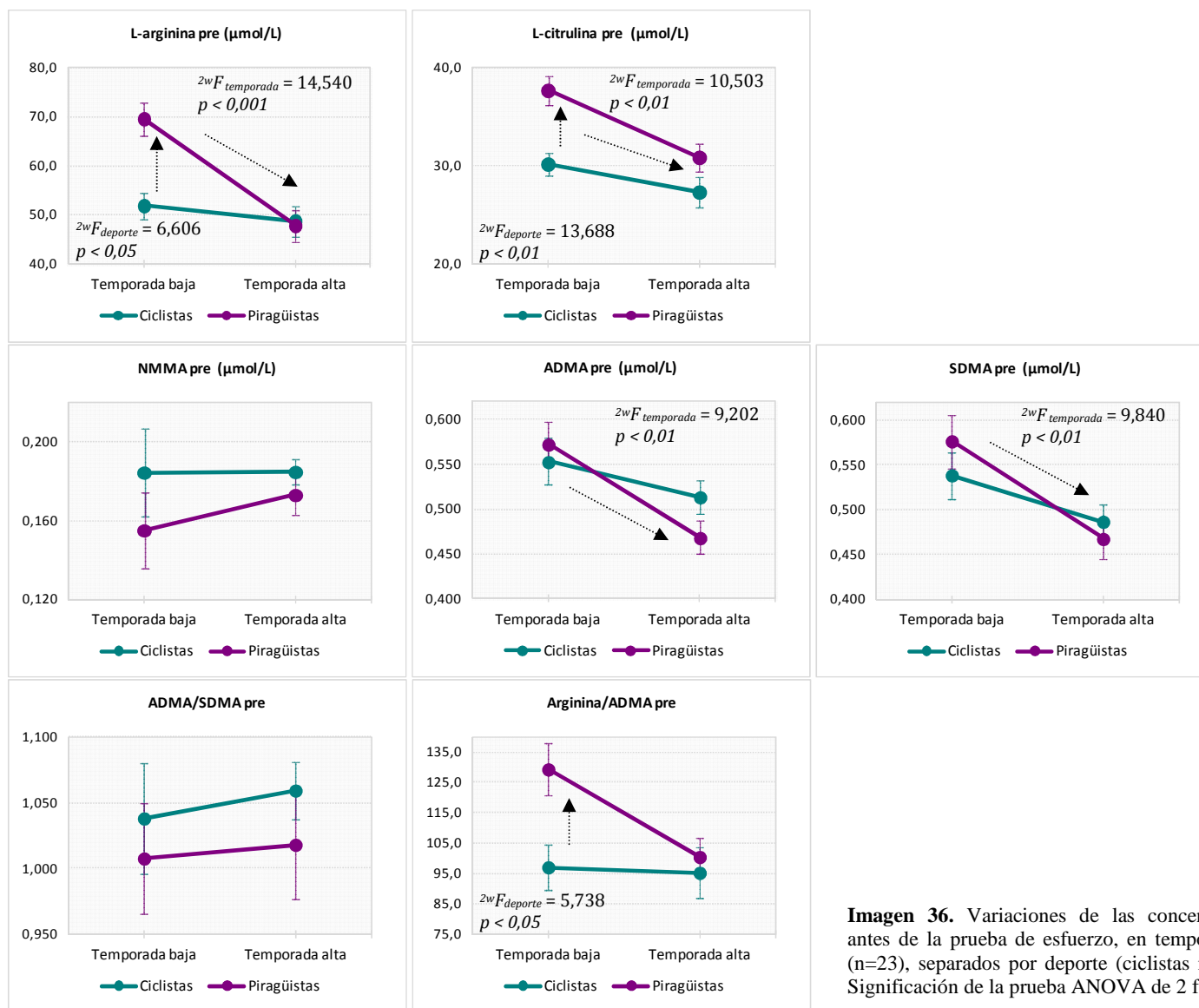


Imagen 36. Variaciones de las concentraciones medias±SEM antes de la prueba de esfuerzo, en temporada baja (n=29) y alta (n=23), separados por deporte (ciclistas n=25, piragüistas n=27). Significación de la prueba ANOVA de 2 factores.

IV. Estudios de correlación

1. Cambios con el ejercicio agudo

Se estudió el grado de asociación de los cambios producidos por el ejercicio en los niveles circulantes de los marcadores estudiados, así como, su relación con los de la función renal, la glucosa y las proteínas. En la Tabla 15 se muestran los resultados del análisis para el grupo total de los deportistas.

Ningún cambio producido por el ejercicio en los marcadores de riesgo estudiados se relacionaba con los cambios en las concentraciones séricas de glucosa. Se observó una correlación global de las variaciones con el ejercicio agudo de la concentración del colesterol total, el cHDL y las apolipoproteínas con las de proteínas totales y albúmina.

Como era de esperar, los cambios en los marcadores metabólicos de tipo lipídico se relacionaban entre sí. Así, la elevación de la concentración del colesterol total con el ejercicio agudo se asociaba a una elevación de la de cLDL y se observaba también una asociación positiva entre las variaciones de la concentraciones de cHDL y de apoA y entre las de cLDL y de apoB. Por otro lado, se observaba una asociación positiva entre las elevaciones séricas de cHDL y creatinina con la elevación de PCRus. Se observaba además una asociación positiva estadísticamente significativa de las variaciones de las concentraciones de apolipoproteínas con la homocisteína total y reducida.

En relación al efecto del ejercicio sobre el metabolismo de los aminotioles, se observaba una asociación positiva entre el incremento plasmático de homocisteína total y reducida y el incremento de creatinina. Se observaba además una asociación estadísticamente significativa entre las elevaciones producidas por el ejercicio en la concentración de homocisteína total y reducida y la elevación sérica de proteínas totales y albúmina. Así mismo, el incremento en la rHcy plasmática correlacionaba con el de la tHcy y con las variaciones del cociente rHcy/tHcy.

No se observaba relación de los cambios producidos por el ejercicio en la concentración de NO con los observados en los marcadores de la función renal y en las proteínas. Por otro lado, los cambios producidos por el ejercicio en las metilargininas no se relacionaban con los observados en las proteínas séricas, en los marcadores de la función renal y en los demás marcadores de riesgo cardiovascular estudiados. En cambio, las variaciones en la concentración de ADMA y SDMA con el ejercicio se relacionaban entre sí y con los respectivos cocientes arginina/ADMA y ADMA/SDMA, pero no con las de los aminoácidos L-arginina y L-citrulina.

Variación (%) \ Variación (%)	Glucosa	Urea	Creatinina	Urato	Proteínas totales	Albumina	Colesterol total	cHDL	cLDL	Apolipoproteína A	Apolipoproteína B	Lipoproteína (a)	Triglicéridos	PCRus	rHcy	tHcy	rHcy/tHcy	NO	L-arginina	L-citrulina	NMMA	ADMA	SDMA	ADMA/SDMA	Arginina/ADMA	
Glucosa	1																									
Urea	-0,135	1																								
Creatinina	0,262	-0,270	1																							
Urato	0,127	-0,172	0,560	1																						
Proteínas totales	0,149	0,006	0,441	0,397	1																					
Albumina	0,100	-0,069	0,490	0,481	0,902	1																				
Colesterol total	-0,174	-0,137	0,160	0,039	0,555	0,511	1																			
cHDL	0,219	0,028	0,281	0,219	0,655	0,716	0,192	1																		
cLDL	0,051	-0,191	0,095	-0,095	0,003	0,133	0,168	-0,025	1																	
Apolipoproteína A	0,132	-0,079	0,234	0,163	0,360	0,433	0,110	0,459	0,239	1																
Apolipoproteína B	0,249	-0,125	0,211	0,139	0,365	0,427	0,119	0,209	0,335	0,562	1															
Lipoproteína (a)	0,015	-0,097	-0,209	-0,121	-0,116	-0,016	-0,067	0,009	-0,051	0,232	0,165	1														
Triglicéridos	-0,06	0,000	-0,267	-0,256	-0,029	-0,173	0,10	-0,411	-0,202	-0,161	-0,246	0,09	1													
PCRus	0,130	0,016	0,457	0,246	0,279	0,219	0,239	0,429	-0,050	0,270	0,255	-0,137	-0,117	1												
rHcy	0,151	-0,261	0,487	0,236	0,370	0,411	0,373	0,212	0,270	0,400	0,491	0,099	-0,113	0,219	1											
tHcy	0,091	-0,100	0,395	0,371	0,309	0,478	0,315	0,234	0,223	0,369	0,416	-0,074	-0,189	0,198	0,641	1										
rHcy/tHcy	0,175	-0,037	0,091	-0,063	-0,078	-0,052	0,168	0,023	0,011	0,098	0,165	0,257	-0,131	0,045	0,605	-0,149	1									
NO	-0,055	-0,07	0,070	0,080	-0,109	0,046	0,023	-0,044	-0,017	0,100	0,226	0,119	-0,136	0,040	0,212	0,242	0,212	1								
L-arginina	0,019	0,124	0,027	-0,011	0,183	0,215	0,168	0,214	-0,133	0,041	-0,210	-0,109	0,039	-0,074	-0,138	-0,160	0,032	-0,128	1							
L-citrulina	0,205	0,062	-0,022	0,012	0,147	0,105	0,131	0,056	0,103	0,013	-0,167	0,014	-0,148	-0,126	0,178	0,024	0,112	0,169	0,551	1						
NMMA	0,269	0,075	0,169	0,277	0,217	0,193	-0,006	0,090	0,027	0,016	-0,03	-0,035	-0,014	0,161	-0,047	0,058	-0,209	0,010	0,128	0,379	1					
ADMA	-0,004	0,057	0,260	0,152	0,213	0,249	0,029	0,097	0,066	0,240	0,170	0,092	-0,142	0,076	0,135	0,014	0,208	0,285	0,184	0,154	0,405	1				
SDMA	0,017	0,039	0,245	0,121	0,129	0,216	0,055	0,061	0,097	0,190	0,150	-0,114	-0,175	0,202	0,170	0,095	0,208	0,299	0,011	-0,164	0,178	0,762	1			
ADMA/SDMA	0,007	0,010	-0,091	0,026	0,159	0,03	-0,031	0,059	-0,014	0,057	-0,258	0,237	0,165	-0,199	-0,040	-0,249	0,021	-0,115	0,207	0,369	0,272	0,342	-0,333	1		
Arginina/ADMA	0,059	-0,065	-0,071	-0,073	0,096	0,117	0,236	0,01	-0,169	-0,099	-0,235	-0,012	0,221	-0,032	-0,139	-0,139	-0,042	-0,198	0,819	0,372	-0,116	-0,203	-0,141	0,033	1	

Tabla 15. Correlación entre los porcentajes de variación antes y después del ejercicio. Coeficiente de correlación de Pearson excepto para arginina, citrulina y rHcy/tHcy (coeficiente de correlación de Spearman). $p < 0,05$ (en color).

2. Asociación entre las concentraciones pre-ejercicio y los cambios con el ejercicio agudo

Se estudio la relación entre los cambios producidos por el ejercicio y sus niveles circulantes pre-ejercicio en cada una de las magnitudes analizadas. En la Tabla 16 se muestran los resultados para el análisis del grupo total de los deportistas.

	Total datos
Glucosa	0,050
Urea	-0,096
Creatinina	-0,260
Urato	-0,181
Proteínas totales	-0,059
Albúmina	-0,128
Colesterol total	-0,200
cHDL	0,022
cLDL	-0,012
Apolipoproteína A	-0,333
Apolipoproteína B	0,010
Lipoproteína (a)	-0,063
Triglicéridos	-0,097
PCRus	-0,176
rHcy	-0,304
tHcy	0,028
rHcy/tHcy	-0,414
NO	-0,562
L-arginina	-0,345
L-citrulina	-0,172
NMMA	-0,534
ADMA	-0,388
SDMA	-0,401
ADMA/SDMA	-0,475
Arginina/ADMA	-0,429

Tabla 16. Correlación entre las concentraciones pre-ejercicio y las variaciones con el ejercicio. Coeficiente de correlación de Pearson excepto para PCRus y rHcy/tHcy basal y variaciones de arginina, citrulina y rHcy/tHcy (coeficiente de correlación de Spearman). $p < 0,05$ (en color).

En general, la mayoría de los FRCV estudiados mostraban un cambio en sus concentraciones plasmáticas con el ejercicio agudo que era inversamente proporcional a sus niveles basales respectivos, con independencia del tipo de ejercicio y del momento de la temporada, aunque en el caso de los marcadores lipídicos esa relación sólo alcanzaba significación estadística en la apolipoproteína A y no se observaba en el caso de la tHcy.

Discusión

I. Hemoconcentración

Para poder comparar los efectos directos del ejercicio en los marcadores estudiados, se evaluó previamente el efecto de las pruebas físicas realizadas sobre el volumen plasmático en respuesta al nivel de entrenamiento y a los dos tipos de ejercicio. Posteriormente, una corrección de las concentraciones para compensar los cambios en el volumen plasmático permitirá la discriminación entre las magnitudes que varían únicamente debido al cambio del volumen plasmático y aquellas otras que responden realmente al ejercicio, sin la influencia de la hemoconcentración/hemodilución^{308,309}.

El volumen de plasma durante el ejercicio y durante el periodo de recuperación posterior no es constante, sino que fluctúa según el estado de hidratación y los cambios temporales en la distribución de líquido entre el sistema circulatorio y el espacio intersticial. La actividad física aguda y los cambios posturales dan lugar a modificaciones en el volumen de plasma que introducirán un error de tipo preanalítico en la determinación de las concentraciones plasmáticas. Desde el inicio del ejercicio se produce una pérdida de volumen plasmático hacia el compartimento intersticial como resultado de una serie de mecanismos^{186,308,310}. En primer lugar, un aumento de la presión hidrostática en el interior de los capilares, lo que genera una extravasación de agua y sustancias disueltas de bajo peso molecular al espacio intersticial¹⁸⁶. A partir de este momento, el líquido extravasado rellena el espacio intersticial y el aumento de la presión intersticial opone una resistencia a la salida de más líquido desde los vasos, estableciéndose un equilibrio de presiones entre los espacios intersticial e intracapilar¹⁸⁷. En segundo lugar, los cambios de volumen de plasma están también influenciados por los gradientes osmóticos¹⁸⁶. En los músculos se acumulan metabolitos, como el lactato, aumentando la presión osmótica intramuscular y promoviendo el movimiento de ultrafiltrado de plasma hacia el intersticio y de ahí a los miocitos. Además, el volumen de plasma también podría verse afectado durante el ejercicio por la pérdida de líquidos debido a la transpiración³⁰⁸, aunque algunos autores han demostrado que la pérdida relativa de fluido corporal no es un mediador importante en los cambios de volumen plasmático³¹¹. Las sustancias que son demasiado grandes para abandonar el sistema circulatorio variarán su concentración, en parte debido a estos cambios en el volumen de plasma.

Para corregir estos defectos se han desarrollado fórmulas que estiman este cambio relativo del volumen plasmático respecto a su valor inicial. Algunos autores han desarrollado fórmulas basadas en los cambios en el hematocrito³¹², sin embargo, se ha demostrado mediante la comparación del hematocrito con la medición directa del volumen de plasma durante el ejercicio, que los cambios porcentuales en este volumen son siempre más grandes que los cambios concomitantes en el hematocrito³¹³. Otros autores³¹⁴, han utilizado el cálculo del cambio en la concentración de proteínas plasmáticas bajo la hipótesis de que las proteínas son las únicas sustancias que no salen de los vasos sanguíneos durante el ejercicio. Sin embargo, esta fórmula ha originado resultados

contradictorios^{315,316} ya que parece que no es válida por igual en todos los individuos, debido a que los cambios de cada proteína en particular no solo están influenciados por la hemoconcentración, sino que varían también según su función y tamaño molecular³¹⁵. La fórmula propuesta por Dill y Costill³⁰⁷ es la más aceptada hasta el momento actual. Utiliza los valores del hematocrito y la concentración de hemoglobina para la estimación de los cambios del volumen sanguíneo, asumiendo que esta proteína no sale de los hematíes ni estos del espacio intravascular durante el ejercicio.

En el presente estudio se han comparado dos tipos de ejercicio diferentes, un ejercicio de fuerza y un ejercicio aeróbico de larga duración y los resultados indican que ningún tipo de ejercicio se asocia con grandes diferencias en la variación del volumen plasmático a los 30 minutos tras la prueba de esfuerzo. La mayoría de los datos publicados relacionados con los cambios en el volumen de líquidos durante el ejercicio se han realizado en un cicloergómetro^{317,318,319,320}, aunque también se han publicado resultados significativos después de nadar^{309,321,322}, correr en cinta^{309,323,324}, maratón³²⁵ y levantamiento de pesas³²⁷. Algunos estudios encuentran que la hemoconcentración después del ejercicio dura aproximadamente de 30 a 60 minutos y es seguida de una hemodilución en los ejercicios de corta duración y alta intensidad^{317,318}, restaurándose el volumen de plasma incluso en ausencia de ingesta de líquidos³¹⁹. En los ejercicios aeróbicos de resistencia se ha demostrado que se produce una hemoconcentración inmediata durante el ejercicio^{322,325} y también se produce una hemodilución posterior que parece estar relacionada con la duración de la sesión^{255,326}. Cuanto mayor es la pérdida de volumen de plasma durante la sesión de ejercicio agudo, mayor es la hemodilución posterior al ejercicio.

En los estudios publicados se encuentran notables diferencias en el momento de la toma de muestra, que puede localizarse entre el primer minuto y las 24 horas tras la finalización. En nuestro caso el momento del muestreo se estableció a los 30 minutos tras la finalización del ejercicio y los cambios en el volumen de plasma demostraron una situación predominante de hemodilución. Este incremento en el volumen de plasma también ha sido descrito por otros autores que realizaron el muestreo a los 30 minutos de recuperación tras un ejercicio en un cicloergómetro³²⁰ (ejercicio aeróbico) o de levantamiento de pesas³²⁷ (ejercicio de fuerza). Existen pocos resultados publicados al respecto en piragüistas o remeros. Jürimäe *et al.*³²⁸ describieron datos muy similares en un grupo de 12 remeros entrenados en los que el volumen de plasma disminuyó significativamente inmediatamente después del ejercicio, y posteriormente observaron un aumento significativo durante los primeros 30 minutos de recuperación que fue mayor después de 2 horas en comparación con el nivel basal.

Recientemente, se ha sugerido que diferentes modalidades de ejercicio como el ciclismo, correr o nadar, pueden afectar a la dinámica de los líquidos corporales de manera distinta debido a los diferentes efectos gravitatorios posturales sobre la distribución compartimental de los fluidos corporales, incluyendo el volumen de plasma³²⁹. Sin embargo, en nuestro caso este efecto postural podrían encontrarse minimizado al tratarse de dos ejercicios que se realizan en una posición corporal similar.

Aunque los tipos de ejercicio estudiados no afectaban de manera diferente al cambio en el volumen de plasma, el nivel de entrenamiento sí parecía influir en la magnitud de este cambio, produciéndose un mayor incremento en temporada baja independientemente del tipo de deporte. La práctica de ejercicio de forma continuada produce por un aumento en el volumen de sangre causado principalmente por una expansión del volumen plasmático^{308,330}. Kjellberg *et al.*³³¹ fueron los primeros investigadores en describir la relación entre la expansión del volumen plasmático y la práctica de ejercicio de forma habitual, y estudios posteriores los han confirmado^{330,332,333}. Sin embargo, otros estudios observaron con posterioridad que la expansión del volumen de sangre alcanza una meseta después de 10 días de entrenamiento³³⁰. Así, en aquellos individuos con un alto nivel de entrenamiento y en buen estado físico, y que ya presentan una hipervolemia inducida por el entrenamiento, se dificultaría la inducción de la expansión del volumen de plasma tras el ejercicio. Por lo tanto, la cambiante condición física de los individuos participantes en el presente estudio habría producido basalmente cambios en el volumen de plasma a lo largo de la temporada deportiva, y las diferencias encontradas en la variación de volumen de plasma con el ejercicio agudo en los dos momentos de la temporada de entrenamiento podrían explicarse por diferencias en esta expansión del volumen del plasma debidas al diferente nivel de entrenamiento. El menor cambio en el volumen de plasma se produce en el momento de la temporada en que los deportistas están sometidos a entrenamientos de más elevada intensidad.

Por otra parte, en temporada alta la prueba se realizó en una competición real mientras que en el momento de la temporada de menor intensidad en los entrenamientos se realizó en un laboratorio, en el que las condiciones ambientales y de ingesta de líquidos se encuentran controladas. Las diferencias climatológicas podrían influir en los cambios de volumen de plasma, ya que al igual que ocurre con el ejercicio físico, el calor produce hemodilución^{308,330}. La aclimatación al calor produce hipervolemia pero la extensión de su variación es generalmente menor que la producida por el ejercicio. Así mismo, se ha descrito que la combinación de la aclimatación al calor y ejercicio induce una mayor expansión del volumen de plasma que la producida solo debido a la práctica de ejercicio³³⁰.

Desde otro punto de vista, cabe destacar que la comparación de ambos grupos de deportistas con respecto a los datos antropométricos mostraba diferencias muy significativas que, sin embargo, no afectaban a estos cambios en el volumen plasmático, así como, a la magnitud de los cambios metabólicos con el ejercicio agudo observados para la mayoría de los FRC estudiados.

II. Parámetros bioquímicos generales

El estudio de algunas magnitudes metabólicas puede aportar información sobre la situación de los procesos adaptativos fisiológicos y bioquímicos que se producen en el organismo durante el ejercicio y durante el entrenamiento. Tras la realización de ejercicio físico intenso todos los grupos de deportistas participantes mostraban un incremento de la concentración media de las magnitudes bioquímicas generales estudiadas, glucosa, urea, creatinina, urato, proteínas y albúmina.

La glucosa plasmática está sujeta a un rígido control homeostático. Es por ello que el elevado consumo de glucosa por parte del músculo esquelético para la producción local de energía en forma de ATP no se refleja en una disminución de la concentración de glucosa, ya que esto es evitado por un incremento de la producción de glucosa hepática mediante la activación de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis en respuesta a las fluctuaciones de la glucosa sanguínea¹⁸⁶. En estos procesos intervienen diferentes cambios hormonales que se producen durante el ejercicio como una disminución de los niveles de insulina y un incremento de los niveles de glucagón, hormona del crecimiento, adrenalina y noradrenalina y cortisol¹⁸⁶. Un estudio realizado en 27 deportistas de resistencia y 34 personas no entrenadas, demostró una variabilidad interindividual en los niveles de glucosa durante un ejercicio de 2 horas de duración³³⁴. Los resultados mostraban que la estabilización del nivel de glucosa era precedida de un ajuste inicial; en el 79% de las personas estudiadas se encontró un descenso transitorio de la glucosa al comienzo del ejercicio, mientras que en el 21% restante apareció un ascenso inmediato. En las personas entrenadas, se superaba el descenso inicial y se establecía un nivel normal de glucosa más rápidamente que en las personas no entrenadas. Algunos autores consideran la hipoglucemia inicial como un estímulo que homeostáticamente aumenta la producción de glucosa por el hígado³³⁵ y el incremento en los niveles de glucosa podría estar relacionado con el rápido aumento de la liberación de la glucosa hepática.

Otro efecto transitorio de la realización de ejercicio físico agudo es un incremento de la concentración de urato, urea y de creatinina, que también ha sido descrito con anterioridad en otros grupos de deportistas^{336,337,338}. El urato contribuye a la defensa antioxidante y actúa como detoxificante de radicales libres³³⁹. Durante el ejercicio, se utilizan los enlaces fosfato ricos en energía de los nucleótidos de purina y las purinas se catabolizan dando lugar a la acumulación de hipoxantina, xantina y urato en los tejidos. Esta conversión metabólica está asociada a su vez a la formación de radicales libres de oxígeno³⁴⁰. Este mecanismo podría explicar el incremento en la concentración de urato observado en este estudio tras el ejercicio que ha sido descrito por otros autores^{337,340,341,342} y se ha relacionado también con la intensidad del ejercicio³⁴³. Por otra parte, se observó una asociación positiva de los incrementos en suero del urato y de la creatinina lo que indica que esta elevación podría estar relacionada también con cambios en la función renal.

Las concentraciones de urea y creatinina se elevan generalmente tras la realización de un ejercicio físico agudo^{344,345} y en el caso de la urea pueden permanecer elevadas de 24 a 40 horas³³⁸. El incremento en la concentración de urea se ha relacionado con un incremento del catabolismo proteico y con la pérdida de sangre intestinal durante el ejercicio^{338,344,345}. En el caso de la creatinina podría estar relacionado con el incremento de la liberación de creatina a la circulación desde el músculo esquelético, producida a partir del fosfato de creatina utilizado como reserva energética, así como, con la reducción temporal del flujo sanguíneo renal y de la filtración glomerular que ocurre tras el ejercicio³⁴⁶. La combinación de los cambios en la función renal y la transformación de creatina liberada desde las fibras musculares en creatinina puede explicar el incremento de creatinina plasmática. En el caso de la creatinina, la concentración plasmática tras la prueba de esfuerzo parecía reflejar diferencias en el nivel de entrenamiento, siendo el incremento observado significativamente mayor en temporada baja. Es, por tanto, concebible que en periodos con menor intensidad o frecuencia de entrenamientos las reservas musculares de fosfato de creatina puedan ser más elevadas o que los cambios adaptativos del flujo sanguíneo renal estén menos afinados.

Durante el ejercicio agudo se produjo un aumento de la concentración de proteínas totales debido a un incremento en la concentración de albúmina, ambos asociados al aumento de la concentración de las apolipoproteínas, y que podrían guardar relación también con los efectos en la función renal, dada la asociación observada con los cambios en la concentración de creatinina. Por otro lado, se han descrito mecanismos directamente implicados en este efecto del ejercicio como el aumento en la tasa de transcripción de albúmina³⁴⁷, la disminución en la tasa de transferencia transcapilar de albúmina^{348,349} y algunos autores sugieren que el movimiento de albúmina desde la linfa al plasma es el principal mediador para la afluencia de líquido al plasma, en la respuesta hipervolémica del ejercicio^{319,350}. No obstante, la elevación de la concentración de proteínas plasmáticas puede no ser un hecho generalizado. Así, Poortmans³¹⁵ observó un aumento de las concentraciones de algunas proteínas durante una hora de práctica de ciclismo, mientras que las concentraciones de otras proteínas permanecían constantes. En este grupo, en el caso de la albúmina, aumentaba hasta el 12% por encima del nivel basal durante los primeros 30 minutos, seguida de un ligero descenso durante los 30 minutos siguientes. La razón de los cambios específicos de cada proteína individual estaría en que, además de la influencia general de la hemoconcentración que puede depender de su tamaño molecular, las concentraciones de las proteínas individuales están controladas también por su función y necesidad.

El tipo de deporte o las diferencias en las características antropométricas parecían condicionar los niveles basales de alguna de estas magnitudes metabólicas generales, observándose concentraciones más elevadas de glucosa en los piragüistas mientras que los ciclistas mostraban concentraciones más elevadas de proteínas. Estas diferencias podrían estar relacionadas con una alimentación que debe adecuarse al tipo de ejercicio realizado^{300,351}, un ejercicio de fuerza en el caso del piragüismo y un ejercicio aeróbico de larga duración en el ciclismo, que demandan en los

deportistas diferentes requerimientos dietéticos. Con respecto al efecto del entrenamiento, a lo largo de la temporada se observó una disminución de las concentraciones pre-ejercicio de glucosa, proteínas totales y albúmina. Estos resultados están de acuerdo con los observados por otros autores tanto en individuos sanos como diabéticos^{337,338}. Estas variaciones podrían en parte ser debidas a los cambios dietéticos adaptados al momento de la temporada de entrenamiento, la competición o la recuperación³⁵¹. Además, la disminución de la concentración pre-ejercicio de glucosa podría relacionarse con la reducción de la resistencia a la insulina que provoca el entrenamiento¹⁸⁰.

III. Marcadores metabólicos de riesgo cardiovascular

1. Lípidos

La práctica regular de ejercicio físico aeróbico se asocia a una mejora del perfil lipídico plasmático y un menor riesgo de enfermedad cardiovascular^{194,195,196}. Los resultados de numerosos estudios coinciden en que el ejercicio físico habitual tiene un efecto positivo en los niveles de lípidos y lipoproteínas, aumentando los niveles de cHDL y disminuyendo los niveles de colesterol total, cLDL y triglicéridos^{197-201,352,353,354}.

El efecto de una prueba de ejercicio agudo sobre la concentración de colesterol total será la suma de los cambios en las diversas subfracciones de lipoproteínas, de modo que resulta del mayor interés la valoración de los cambios en las concentraciones de las subfracciones de colesterol y de las concentraciones de las apolipoproteínas que las constituyen. A este respecto, se ha observado en general una respuesta al ejercicio físico agudo, a los 30 minutos de la finalización de las pruebas, que es independiente del nivel de entrenamiento y del tipo de ejercicio estudiado, algo que corrobora el trabajo de otros autores^{211,355}. Muchos de los estudios realizados han encontrado elevaciones de la concentración de colesterol total tras series individuales de ejercicio que se acompañan de un aumento de cHDL como el que se observa en el presente trabajo, con cifras que van desde 4 al 43% aunque no todos²¹⁵. Esta elevación ha sido descrita ampliamente en la literatura tras la práctica de diferentes tipos de ejercicio agudo: corredores en cinta^{214,207,208}, maratón²⁰⁹, en cicloergómetro^{210,238}, baloncesto, lucha²¹¹ y tanto en individuos entrenados^{207,210,214,238} como no entrenados^{208,212}. Así mismo, el incremento en el cHDL con el ejercicio agudo en sujetos sedentarios parece ser debido al aumento en la fracción HDL3, mientras que en individuos entrenados aumenta más la fracción HDL2²¹⁰. El aumento inducido por el ejercicio en el cHDL podría ser consecuencia de una actividad incrementada de la LPL ya que se ha descrito un aumento en la actividad de la LPL de forma simultánea al aumento de la concentración de cHDL tras un ejercicio prolongado³⁵⁶.

Por otro lado, Hill *et al.*²¹³ describieron diferencias en el incremento de los niveles de cHDL tras una prueba de esfuerzo de forma dependiente de la intensidad del ejercicio y consideraron que para que se produzcan cambios metabólicos que impliquen alteraciones en el cHDL se debe llegar a un umbral de intensidad de ejercicio. Sin embargo, los niveles de intensidad de los protocolos de entrenamiento utilizados en su caso eran más bajos que los utilizados en un entrenamiento de resistencia normal. Las principales diferencias al comparar los estudios publicados se encuentran en los tiempos de muestreo tras la finalización de la prueba³⁵⁷. La elevación de la concentración de cHDL tras el ejercicio en algunos casos se observa de forma inmediata tras el ejercicio^{214,210}, y en otros comienza a observarse a las 24 horas tras la finalización de la prueba^{208,210,238}. En el estudio realizado

por Kantor *et al.*²¹⁰ en individuos entrenados tras una prueba de esfuerzo en un cicloergómetro, la elevación de la concentración de cHDL se observaba inmediatamente tras una prueba de mayor duración (120 min), mientras que tras una prueba de menor duración (60 min) la elevación no alcanza significación estadística hasta las 24 horas.

Con respecto al efecto del nivel de entrenamiento en la concentración pre-ejercicio de cHDL, en nuestros deportistas no se observaban diferencias según la intensidad de los entrenamientos pero existían diferencias entre ambos tipos de ejercicio con concentraciones basales más elevadas en los ciclistas. Un reciente metanálisis realizado por Kodama *et al.*³⁵⁸ revisó sistemáticamente la literatura publicada desde 1996 a 2005 con relación al efecto del ejercicio aeróbico sobre el cHDL. Los autores concluyen que el entrenamiento regular aumenta discretamente los niveles de cHDL y que uno de los factores más influyentes es la duración de las sesiones de entrenamiento que, en nuestro caso, podría ser la causa también de la concentración basal más elevada observada en los ciclistas en temporada alta. Aunque el mecanismo biológico subyacente es desconocido algunos autores han relacionado el entrenamiento con una menor catabolización de las HDL, alargando su vida media biológica en individuos entrenados a consecuencia de la transferencia aumentada de lípidos hacia las HDL por la LPL y el aclaramiento disminuido de HDL por la lipasa hepática³⁵⁹.

Respecto a la concentración de cLDL, nuestros resultados no mostraban cambios significativos tras las series individuales de ejercicio, algo que corroboran otros estudios tras pruebas de carrera en cinta^{207,212,215} o en un cicloergómetro²¹⁰, aunque otros autores observaron que la concentración de cLDL disminuía significativamente tras diferentes pruebas de esfuerzo en individuos entrenados^{209,216}. Al contrario que en el cHDL, las diferencias podrían ser debidas a que los cambios en el cLDL no se producirían de forma inmediata sino a las 24 a 48 horas tras la finalización del ejercicio^{356,360}. Por otra parte, el efecto del entrenamiento de disminución de la concentración basal de cLDL ha sido descrito como un efecto relativamente débil (5-10%)^{219,268,361} y, al igual que se observa en nuestro caso con concentraciones más bajas de cLDL cuanto mayor es el nivel de entrenamiento, que se acompaña además de una disminución de la apoB sérica.

Las investigaciones publicadas respecto al efecto de series individuales de ejercicio intenso en la concentración de las apolipoproteínas A y B y de la lp(a) muestran resultados en general, variables y contradictorios. Algunos estudios realizados en hombres hipercolesterolémicos describen un aumento transitorio en la concentración de apoA y apoB tras la práctica de ejercicio físico²³⁸, mientras que otros describen una disminución de la concentración de apoB y una elevación de apoA tras el ejercicio, tanto en atletas como en individuos sedentarios sanos^{216,227,228,229}. Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados en hombres normocolesterolémicos, las concentraciones de apoA y apoB no varían significativamente tras el ejercicio agudo^{210,215,225,226}. Las discrepancias podrían ser debidas a diferencias en los valores basales de los individuos participantes en estos estudios ya que, tal y como se observa en nuestros resultados, al menos para la apoA parece existir una asociación negativa entre los valores pre-ejercicio de apoA y su elevación tras la prueba.

Paralelamente al incremento de los niveles de cHDL con el ejercicio agudo se producía una elevación de la concentración de la apoA que es el principal componente proteico de las HDL. Mientras que un aumento en la concentración de cHDL con el ejercicio agudo en ausencia de cambios en la apoA indicaría que los cambios en el cHDL sérico serían principalmente debidos a la cesión de colesterol a las partículas HDL^{240,356}, la asociación de ambas magnitudes observada en nuestros resultados parece indicar que el ejercicio agudo podría producir una elevación concomitante del número de partículas HDL. Por otra parte, la elevación de la apoB, principal componente proteico de las partículas LDL, a los 30 minutos de finalización de las pruebas era independiente del deporte o el momento de la temporada considerados y mostraba una asociación positiva con la variación tras el ejercicio de cLDL. Este aumento de la apoB podría indicar la existencia de un mayor número de partículas de LDL en la circulación, no necesariamente del colesterol transportado en estas lipoproteínas ya que el aumento porcentual de éste con el ejercicio era significativamente menor.

A lo largo de la temporada de entrenamiento, se observaba en una disminución de las concentraciones basales de apoB que, al igual que sucede en el colesterol total y cLDL, era relativamente moderada: 20%, 12% y 19%, respectivamente. Los atletas de resistencia presentan en general concentraciones de apoA-I y A-II un 25% y 15% más altas que los individuos sedentarios^{219,220}, mientras que las concentraciones de apoB, son un 6-7% inferiores^{221,242}. Sin embargo, estudios realizados en hombres previamente inactivos después de un programa de acondicionamiento físico se observan disminuciones de las concentraciones de apoA-I³⁶².

Existe muy poca información disponible en lo que concierne al efecto del ejercicio en la lp(a). Sin embargo, nuestros resultados concuerdan con los publicados hasta la fecha que no observan diferencias en la concentración de lp(a) tras la realización de un ejercicio agudo en individuos entrenados^{234,235}, evaluando diferentes intensidades de ejercicio²³⁴, y considerando el efecto inmediato tras el ejercicio^{234,235} o a los 30 minutos²³⁶. Por otra parte, la lp(a) se ha descrito como una proteína de fase aguda ya que se observa una elevación plasmática en situaciones como el postoperatorio, el infarto de miocardio y la angina de pecho^{258,259,260}. Además, los hallazgos inmunohistoquímicos sugieren que la lp(a) puede jugar un papel importante en la reparación de la lesión del tejido, especialmente en el proceso de la angiogénesis²⁵⁸. Sin embargo, la participación de la lp(a) en la respuesta de fase aguda no es clara ya que no se eleva en la artritis reumatoide³⁶³ e incluso puede mostrar un comportamiento como reactante de fase aguda negativo en la sepsis y en las quemaduras³⁶⁴. La ausencia de cambios significativos que se observan tras el ejercicio agudo frente a los modestos incrementos que ocurrían en un marcador de inflamación como la PCRus apuntarían a una falta de respuesta o insuficiencia de estímulo.

En general los estudios publicados confirman nuestros resultados y sugieren que la concentración de lp(a) no está influenciada por la actividad física moderada o el entrenamiento en adultos^{221,224,230,231,365}. Si bien es cierto que otros estudios contradicen esta observación^{232,366,367} y que parece que los niños altamente activos tendrían niveles de lp(a) menores que los niños sedentarios²²³.

La concentración de lp(a) es determinada en gran parte genéticamente y parece no cambiar por intervenciones que pueden modificar otras lipoproteínas como la dieta, el ejercicio o la medicación hipolipemiente^{224,368}. Además, algunos autores han sugerido que la razón por la que el entrenamiento pudiera afectar solo a algunos individuos podría estar relacionada con la presencia de isoformas de lp(a) más sensibles al efecto del entrenamiento²²⁴.

La concentración de triglicéridos se incrementaba tras la prueba física, de forma más acusada en los piragüistas y, en ambos grupos, en el momento de la temporada con un mayor nivel de entrenamiento. La elevación en la concentración de triglicéridos tras series individuales de ejercicio ha sido también observada por otros autores que describen un incremento inicial seguido de un descenso continuo de la concentración después de las pruebas^{209,238,369}. La causa de esta elevación inicial podría ser resultado de la movilización de los triglicéridos de las reservas de grasa, como indicaría una elevación concomitante del glicerol sérico³⁶⁹. Por el contrario, la mayoría de los estudios publicados describen un efecto hipotrigliceridémico tardío, produciéndose una disminución de la concentración de triglicéridos a las 18 ó 24 horas después del ejercicio que persiste hasta las 72 horas^{208,214,216,241}, y esta reducción en algunos casos se observa ya durante e inmediatamente después del ejercicio^{216,241}, mientras que otros no encuentran ningún cambio^{208,212,214}. Crouse *et al.*²³⁸ estudiaron en varones sedentarios la respuesta de los triglicéridos séricos a una sesión de ejercicio a distintas intensidades, y las adaptaciones a un programa de entrenamiento durante 24 semanas. Una sesión de ejercicio en cicloergómetro originaba un incremento en las concentraciones de triglicéridos desde los 5 minutos postesfuerzo, con independencia del estado de entrenamiento. Por ello, el incremento que observamos en nuestros resultados a los 30 minutos de la prueba en el momento de la temporada con mayor nivel de entrenamiento podría indicar simplemente una respuesta hipertrigliceridémica más prolongada. Por tanto, nuestros resultados demostrarían probablemente un efecto hipertrigliceridémico transitorio del ejercicio agudo que no parece producir adaptaciones a largo plazo con el entrenamiento ya que la concentraciones basales se mantienen constantes a lo largo de la temporada.

Como era de esperar, los cambios séricos con el ejercicio en los marcadores de tipo lipídico se relacionan entre sí de acuerdo con sus interacciones metabólicas, y se asociaban también a algunas variaciones en los otros FRC estudiados que se comentarán más adelante. De forma inesperada, nuestros resultados muestran una asociación negativa entre la elevación de las concentraciones de triglicéridos y de cHDL con el ejercicio agudo a pesar de que los datos sugerirían más bien un efecto paralelo entre ambas, que se explicaría por la mediación de cambios metabólicos comunes, como han sugerido previamente otros autores²¹⁴ y que estarían relacionados con el posible estímulo de la LPL³⁷⁰ ya comentado. Otros²⁴⁰ han descrito una relación inversa entre la disminución de los triglicéridos y la elevación de cHDL que, sin embargo, se refiere al posterior efecto hipotrigliceridémico del ejercicio cuando se realiza la toma de muestra a tiempos más largos.

2. Proteína C reactiva

El efecto beneficioso del ejercicio físico sobre el riesgo cardiovascular, reflejado en los niveles de alguno de los marcadores bioquímicos, se ha relacionado con sus posibles acciones sobre el proceso inflamatorio vascular subyacente. Por otra parte, se ha demostrado que el ejercicio de alta intensidad provoca un estado inflamatorio, con un aumento de la producción de reactantes de fase aguda y citocinas proinflamatorias^{243,245,246}. A este respecto, los deportistas estudiados mostraban una débil respuesta inflamatoria al ejercicio físico agudo, de acuerdo al cambio observado en las concentraciones de PCRus a los 30 minutos de la finalización de las pruebas, el cual era independiente del tipo de ejercicio realizado.

Otros estudios realizados en corredores han demostrado elevaciones transitorias de la concentración de PCR, inmediatamente después y 24 horas tras la finalización de la prueba que volvían a sus valores basales entre el segundo y sexto día^{253,254,255}. Strachan *et al.*²⁵⁶ han mostrado que esta respuesta de fase aguda tras el ejercicio puede ser proporcional a la cantidad de actividad y de lesión o daño muscular. Así, en 38 corredores entrenados después de la competición observaron un incremento de las concentraciones de PCR proporcional a la duración de la carrera y a las concentraciones séricas de CK. La respuesta de fase aguda también podría depender la masa muscular involucrada, como parecía demostrar un estudio realizado en 14 sujetos no entrenados²⁵⁷, en el cual no se evidenciaba elevación en los marcadores inflamatorios tras la realización de un ejercicio excéntrico de los flexores del codo, a pesar del aumento de los niveles de CK.

Los mecanismos mediadores en la respuesta aguda al ejercicio no están totalmente dilucidados en la actualidad. Las interleucinas IL-1 y IL-6 se encuentran involucradas en esta respuesta, puesto que se elevan temporalmente durante y poco después el ejercicio prolongado^{371,372}. La IL-6 se eleva unas 100 veces tras un ejercicio intenso y estimula la síntesis hepática de la PCR^{371,372,373}, siendo este incremento de la IL-6 la primera respuesta de las citocinas al ejercicio y la más importante³⁷³. El ejercicio agudo también produce un incremento en varios mediadores antiinflamatorios, como los inhibidores de citocina, el antagonista del receptor de IL-1, los receptores de TNF α , IL-10 e IL-8, o las proteínas inflamatorias de los macrófagos 1-alfa y 1-beta^{371,372,373,374}, mientras que las moléculas de adhesión leucocitaria, como las integrinas beta-1 y beta-2, disminuyen³⁷⁵. Por lo tanto, parece existir un efecto regulador paralelo, protector y antiinflamatorio que también forma parte de la respuesta al ejercicio agudo.

En nuestro estudio la elevación de la PCRus tras una serie individual de ejercicio, desaparecía con un mayor nivel de entrenamiento ya que no se observaba en temporada alta, por tanto, el entrenamiento parece atenuar la respuesta inflamatoria al ejercicio agudo. Igualmente, Liesen *et al.*³⁷⁶ examinaron la respuesta de fase aguda tras 3 horas de carrera, antes y después de 9 semanas de entrenamiento de resistencia y observaron un descenso en las variaciones en las proteínas de fase aguda, PCR, haptoglobina y α 1-glicoproteína. La variación post-ejercicio antes de entrenamiento era

de un 40%, 30% y 60% respectivamente y tras 9 semanas de entrenamiento era de un 10%, 12% y 20%. La causa de la menor respuesta inflamatoria observada en nuestro caso tras el ejercicio, podría encontrarse en que el tiempo transcurrido no ha sido suficiente para que IL-6 estimule la síntesis hepática de la PCR.

Otros estudios demuestran una relación inversa entre la actividad física regular y la concentración sérica de la PCR^{247,248}, describiendo diferencias en los efectos del entrenamiento según el tipo de ejercicio^{247,249}, como ocurre en nuestro caso con los niveles más bajos de PCRus observados en los piragüistas a lo largo de toda la temporada, aunque esa diferencia sólo alcanzaba significación estadística en temporada alta, probablemente por el efecto aditivo sobre los niveles basales de realizarse el estudio en mitad de una competición ciclista de varios días de duración. Dufaux *et al.*²⁴⁷ describieron diferencias en los niveles séricos de PCR, más bajos en nadadores que en remeros y a su vez en remeros más bajos que en futbolistas. Así mismo, el efecto de tipo de ejercicio en los marcadores de inflamación también fue estudiado en población general por King *et al.*²⁴⁹ que examinaron una cohorte 4072 participantes en el estudio NHANES del CDC y asociaron actividades como el footing, la natación, el ciclismo o el aeróbico con una menor probabilidad de elevación de los marcadores inflamatorios.

A pesar de la asociación directa entre inflamación y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares son pocos los estudios que han evaluado la relación entre los niveles de PCR y los de otros factores de riesgo cardiovascular^{250,251,252} y menos aún considerando el efecto del ejercicio^{377,378}. En nuestro caso, la variación de los niveles de PCRus con el ejercicio se asociaba positivamente tanto con la creatinina, al igual que ocurría con las proteínas totales y la albúmina, como con la observada en el cHDL, mientras que la correspondiente con los cambios en la apolipoproteína A sérica no alcanzaba significación estadística. Esta asociación con cHDL además se mantenía en ambos momentos de la temporada a pesar de que cuando mayor era el entrenamiento la concentración de PCRus no variaba de forma significativa con el ejercicio agudo. Rohde *et al.*²⁵⁰, en un estudio transversal de 1172 varones aparentemente sanos encontraron asociaciones positivas entre los niveles circulantes en reposo de PCR y la edad, número de cigarrillos al día, el índice de masa corporal, presión arterial sistólica y diastólica, colesterol total, triglicéridos, lp(a), apoB, y homocisteína, así como, asociaciones inversas con el cHDL y la apoA, aunque no se valoraba la condición física previa de los participantes. Por otra parte, se ha observado que en la sepsis, las lipoproteínas HDL y la apoA pueden convertirse en reactantes de fase aguda, con propiedades anti-inflamatorias y pro-oxidantes^{379,380}, pudiendo ser esta una causa de la asociación entre las elevaciones con el ejercicio de PCRus y cHDL, apuntando a que la elevación del cHDL se podría producir en parte como respuesta inflamatoria.

3. Homocisteína y equilibrio tiol-redox

Para estudiar este sistema antioxidante, se ha llevado a cabo la optimización de un método cromatográfico en fase reversa que permite la separación y cuantificación de la concentración total de homocisteína, así como la de su forma reducida.

Los valores normales de tHcy en plasma se consideran habitualmente entre 5 y 15 $\mu\text{mol/L}$ ³⁸¹. Los valores más elevados de homocisteína plasmática se observan en individuos con homocistinuria, en los que pueden encontrarse severas hiperhomocisteinurias con concentraciones de hasta 500 $\mu\text{mol/L}$. Por otro lado, no existen en la literatura valores de referencia para los niveles plasmáticos de las formas reducidas de homocisteína, sin embargo, de forma general estas representan un 1-2% de la tHcy³⁸¹.

El estilo de vida y otros factores fisiológicos se han relacionado con las variaciones de las concentraciones circulantes de homocisteína^{273,382,383}, edad, sexo, dieta, tabaco, alcohol, café o una actividad física regular. De una comparación epidemiológica directa entre individuos sedentarios y activos puede ser difícil establecer una relación causal entre la actividad física y la concentración de homocisteína, debido a que los sujetos con estilos de vida activos tienden a ser más conscientes de otros factores beneficiosos de la salud, como el no fumar, la reducción del consumo de alcohol o el consumo de una dieta equilibrada. En este sentido, la selección de los grupos experimentales en este estudio ha supuesto minimizar la influencia de estas posibles fuentes de variación y ha permitido evaluar directamente el efecto del ejercicio y del nivel de entrenamiento.

Las concentraciones plasmáticas de tHcy y rHcy obtenidas en los deportistas estudiados, son similares a las descritas por otros autores en diferentes estudios empleando el mismo, SBDF^{384,385}, y otros procedimientos de derivación, como 4,4'-ditiopiridina³⁸⁶, monobromobimano³⁸⁷ o de 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol-4-sulfonamida (ABD-F)³⁸⁸. Los sulfobenzofuranos halogenados, como el ABD-F y el SBDF, producen con los aminotioles unos productos de reacción fluorescentes y estables³⁸¹, permitiendo la realización de series analíticas largas. Además, no forman productos de hidrólisis fluorescentes, como ocurre en el caso de los monobromobimanos³⁸⁹. El ABD-F requiere condiciones de reacción menos drásticas que el SBDF, sin embargo su mayor reactividad hace que reaccione con otro tipo de compuestos presentes, como las aminas y ciertos grupos hidroxilo y amino de las proteínas³⁹⁰, apareciendo picos interferentes en la determinación de los tioles³⁸¹. La menor reactividad del SBDF hace necesario incubar la reacción a una temperatura de 60°C, aunque esta menor reactividad puede ser una ventaja para determinar las formas reducidas libres sin posibles interferencias. Sin embargo, se ha observado que el rendimiento de la reacción de derivatización de las formas reducidas con SBD-F disminuye en presencia de formas oxidadas de los tioles al verse afectada por reacciones de intercambio entre tioles³⁹¹. En este sentido, no es posible descartar totalmente que las concentraciones de rHcy medidas estén sujetas a un cierto grado de interferencia.

Los resultados indican que la actividad física aguda eleva las concentraciones plasmáticas de tHcy y que esta elevación está asociada con un aumento en la rHcy. Además este efecto hiperhomocisteinémico era independiente del tipo de ejercicio y del nivel de entrenamiento. El aumento de las concentraciones de tHcy en plasma con el ejercicio agudo también se ha observado en corredores de cinta (10%) después de 30 minutos²⁷⁴, corredores de maratón (19%) a las 24 horas de terminar la carrera^{277,392} y en atletas de triatlón tras una competición²⁶³. Recientemente, ha sido descrita una elevación transitoria de la tHcy en individuos sedentarios que realizaron un ejercicio agudo a diferentes intensidades²⁸³. Por el contrario, otros estudios no han encontrado cambios significativos en las concentraciones plasmáticas de tHcy después de un ejercicio agudo en un cicloergómetro^{279,280,281} o en futbolistas tras un test anaeróbico de Wingate³⁹³, e incluso se ha encontrado que la concentración de homocisteína disminuye en sujetos entrenados²⁸².

Las discrepancias pueden ser debidas al empleo de diferentes metodologías o procedimientos experimentales, como la toma de las muestras realizada en diferentes momentos del período de recuperación después del ejercicio o el empleo de fórmulas inapropiadas para la corrección de los cambios en el volumen de plasma. En nuestro estudio, la toma de muestras se realiza a los 30 minutos y los resultados son acordes con aquellos realizados a tiempos que van desde los 15 minutos²⁷⁷, 30 minutos²⁷⁴, 1 hora²⁶³ e incluso 24 horas³⁹² tras la prueba, mientras que difieren de los que realizan la toma de muestra inmediata a la finalización de la prueba (3 minutos)^{280,281,393}.

En cualquier caso este aumento observado podría ser transitorio y la concentración de homocisteína volvería a los niveles basales trascurrido un periodo de recuperación. Así, se han descrito cambios dinámicos en las concentraciones de tHcy durante el ejercicio y durante el periodo de recuperación en individuos sedentarios²⁸³ que explicarían la heterogeneidad en los resultados publicados. En estos individuos se ha descrito un aumento significativo de la tHcy durante un ejercicio al 80% de la $VO_{2\text{ max}}$ alcanzando un máximo a los 25 minutos de ejercicio del 25,7%. A partir de este momento la concentración de tHcy comenzaba a disminuir y este descenso continuaba tras el cese del ejercicio, retornando a los valores basales a las 19 horas de la finalización de la prueba. Al realizar la prueba a una menor intensidad (40% $VO_{2\text{ max}}$), la elevación observada fue menor, alcanzando el máximo a los 37,5 minutos de ejercicio y del orden del 9,3% con respecto a la concentración basal. En cambio, en individuos entrenados²⁸², se ha descrito una caída significativa en la concentración plasmática de tHcy durante el transcurso del ejercicio, con la vuelta a los valores basales a partir del minuto 2 del periodo de recuperación hasta el minuto 15, aunque es de reseñar que en ambos casos no se realizaba una corrección del volumen plasmático tras el ejercicio.

El efecto del ejercicio agudo sobre la concentración de rHcy ha sido previamente estudiado por Zinellu *et al.*²⁸⁰ quienes encontraron concentraciones de rHcy más bajas inmediatamente después (3 minutos) de una prueba de esfuerzo en un cicloergómetro en dos grupos de sujetos, atletas y sedentarios, mientras que no observaron cambios equivalentes en la tHcy. Así, concluían que el cambio en la homocisteína plasmática después del ejercicio podría ser debido a sus efectos

metabólicos más que a un ajuste en el equilibrio tiol-redox. Además, en estos mismos sujetos, Sotgia *et al.*²⁸¹ relacionaron estos cambios en los niveles de plasmáticos de rHcy con el aumento que observaban en la concentración de la creatina en plasma. Los resultados de estos autores son aparentemente opuestos a los observados en nuestro estudio, que muestran incrementos de la rHcy y de la tHcy a los 30 minutos tras la finalización del ejercicio agudo. Esta discrepancia nuevamente podría ser explicada por las diferencias en los tiempos de muestreo durante el periodo de recuperación y al diferente procedimiento de corrección de la hemoconcentración empleado por Zinellu y Sotgia, basado en la concentración de las proteínas plasmáticas.

El mecanismo exacto por el cual las concentraciones plasmáticas de tHcy aumentan con después de un ejercicio intenso no ha sido totalmente aclarado. Se ha demostrado que el ejercicio agudo aumenta el consumo de oxígeno y la producción de radicales libres¹⁸⁹, que a su vez podría influir en el intercambio tiol-disulfuro y en las reacciones tiol-redox que conducirían a un aumento de las formas oxidadas en plasma con el consiguiente aumento de las concentraciones de tHcy y reducción del ratio rHcy/tHcy. Otros posibles mecanismos que podrían explicar el efecto hiperhomocisteinémico del ejercicio agudo estarían relacionados con el estrés metabólico inducido por el ejercicio. La actividad física aguda puede acelerar el catabolismo de las proteínas y aminoácidos en el músculo esquelético³⁹⁴, incrementando la producción de homocisteína derivada del metabolismo de la metionina^{277,395}. El aumento de la disponibilidad de metionina podría explicar en parte el aumento de la homocisteína²⁶³ con el ejercicio por activación de la vía de la transulfuración³⁹⁶.

Además, el ejercicio puede implicar un aumento de la demanda de sustratos metilados, tales como la creatina o la acetilcolina²⁷⁷, llevando a un consumo acelerado del donador de grupos metilo S-adenosilmetionina, dando lugar a S-adenosil homocisteína, que es hidrolizado a homocisteína y adenosina³⁹⁷. En ambos casos, la síntesis celular de homocisteína se produciría en su forma reducida y el exceso de rHcy se exportaría al espacio extracelular donde posteriormente se oxidaría³⁹⁸ por lo que el aumento de rHcy plasmática se acompañaría de un aumento en la tHcy plasmática, tal como se observa en los ciclistas y piragüistas estudiados. Por el contrario, un posible hallazgo de elevación de la concentración de la tHcy después del ejercicio sin una elevación correspondiente de la rHcy, estaría probablemente más relacionado con diferencias en las tasas de eliminación de las formas reducidas y oxidadas de la sangre³⁹⁹. El ejercicio físico agudo elevaba los niveles circulantes de ambos tipos de homocisteína plasmática, no obstante, el incremento observado en las formas reducidas parece ser proporcionalmente menor que el de las formas oxidadas, lo que da lugar a un descenso en la relación entre las concentraciones reducidas y totales. Este cambio en el ratio rHcy/tHcy refleja probablemente una situación de elevado estrés oxidativo, con acumulación de la fracción unida a proteínas que por su más lenta eliminación explicaría la elevación de la tHcy que se ha observado habitualmente en el ejercicio físico agudo.

Los cambios en la concentración de creatinina en plasma después del ejercicio se han relacionado con una reducción temporal del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración

glomerular³⁴⁶. Así mismo, la eliminación de homocisteína por el riñón parece ser dependiente del flujo renal de plasma⁴⁰⁰ y, de hecho, en la enfermedad renal crónica se han descrito mayores concentraciones de aminotioles reducidos y totales^{384,401}. Nuestros resultados muestran una asociación de los cambios en los aminotioles y la creatinina plasmáticos con el ejercicio que, por tanto, podría indicar un papel importante de la función renal en el aumento de las concentraciones de aminotioles en el periodo post-ejercicio.

Se ha sugerido^{402,403} que el exceso de homocisteína incrementa la producción del radical superóxido y aumenta la degradación de NO por oxidación. Por otra parte, el efecto aterogénico de la homocisteína se ha relacionado también con su contribución a la disfunción endotelial a través del aumento de ADMA mediante la disminución de la actividad de la DDAH, enzima que degrada el ADMA a L-citrulina y dimetilamina, con la consecuente disminución de la biodisponibilidad de NO¹⁶⁰. Sin embargo, contrariamente a estas hipótesis, en los participantes en este estudio no se evidenciaba una relación inversa entre los cambios plasmáticos producidos por el ejercicio en la tHcy y el NO.

El efecto hiperhomocisteinémico del ejercicio agudo era independiente de la prueba deportiva practicada, así como, del incremento en el nivel de entrenamiento a lo largo de la temporada. Además, la elevación que se producía con el ejercicio agudo, probablemente transitoria, no conducía a un incremento permanente de las concentraciones pre-ejercicio de rHcy y tHcy. Por tanto, la movilización de homocisteína en respuesta al ejercicio físico agudo no parece participar en la adaptación del organismo al ejercicio físico regular. Por otro lado, los ciclistas mostraban un aumento significativo del ratio rHcy/tHcy pre-ejercicio en temporada alta que no se observaba en los piragüistas, y que podría estar causado por el hecho de que estos deportistas se encontraban en una competición ciclista y realizaban la prueba de esfuerzo tras varios días de carrera, lo que podría suponer que los niveles basales de rHcy estuviesen influenciados por el ejercicio agudo realizado en los días previos, mientras que esto no ocurría en temporada baja y tampoco en los piragüistas en ambos momentos de la temporada.

En cuanto al efecto de diferentes programas de entrenamiento en la concentración de homocisteína existen resultados contradictorios que no permiten llegar a conclusiones claras. Mientras que algunos estudios revelan una disminución de la homocisteína con el entrenamiento aeróbico²⁶¹, otros han encontrado ausencia de cambios²⁶⁸ o incluso incrementos en la concentración de homocisteína^{269,270}. En cuanto al entrenamiento con ejercicios de resistencia se observado que la homocisteína disminuía tras un programa de ejercicios^{271,272}. Sin embargo, en la comparación de estos estudios se deben considerar una serie de aspectos que introducen confusión, como la posible administración de suplementos o que algunos se han realizado en mujeres lo que dificulta la comparación, además de las diferencias en la duración e intensidad del entrenamiento realizado. En nuestro caso, los diferentes entrenamientos realizados por los deportistas, de resistencia y de fuerza, parecían conducir a adaptaciones similares en el metabolismo de la homocisteína.

El aumento de las concentraciones de la homocisteína total y reducida tras el ejercicio agudo se asociaba positivamente a las variaciones de la concentración de apolipoproteínas y del colesterol total, aunque no alcanzaba significación para el cHDL y cLDL. Es posible que esta asociación guarde simplemente relación con la existencia de una fracción importante de homocisteína unida a las apolipoproteínas circulantes, como reflejaría también la asociación con los niveles séricos de proteínas totales y albúmina que parece depender de los cambios en la función renal. Al contrario, algunos autores^{404,405} han observado que los niveles de homocisteína en individuos sedentarios están asociados negativamente con los de cHDL y de la apoA sin embargo, el efecto del ejercicio agudo no había sido valorado hasta el momento.

4. Óxido nítrico y dimetilarginina asimétrica

La producción de NO es uno de los principales mecanismos implicados en el funcionamiento del endotelio. Su síntesis se realiza a partir de la arginina por acción de la eNOS, enzima de la que el ADMA es un inhibidor competitivo endógeno. La disfunción endotelial por una alteración en la síntesis o en la acción del NO constituye un paso esencial en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. Cuando se genera un cambio en su producción, como ocurre en el ejercicio físico²⁸⁵, se produce una modificación de la fisiología endotelial que puede ser utilizada para comprender las consecuencias patológicas que se producen en el curso de la disfunción endotelial.

Muchos de los estudios publicados acerca del efecto del ejercicio agudo en la función vascular se basan en la medición de la vasodilatación mediada por el flujo (VMF) en la arteria femoral^{406,407} o braquial^{408,409} como medida indirecta de la bioactividad de NO derivado del endotelio. La prueba consiste en la medida del incremento de la irrigación sanguínea (aumento del diámetro de la arteria) por restitución del flujo, tras provocar una isquemia transitoria mediante la oclusión de la arteria con un manguito neumático. Sin embargo, algunos autores^{410,411,412,413} cuestionan su utilización, ya que parece que la dilatación producida tras la oclusión tiene una parte sustancial no mediada por el NO y más probablemente relacionada con la isquemia del tejido.

La relación entre la concentración de nitritos y nitratos en sangre y la producción de NO ha quedado patente en diferentes estudios^{414,415,416}. Sin embargo, su determinación ha sido menos utilizada en el estudio de los efectos producidos por el ejercicio físico. La corta vida media y el rápido metabolismo del NO en la circulación hace que sea poco práctico medir directamente el NO, y la actividad enzimática de la eNOS solo puede determinarse en las células. El NO formado en el endotelio puede transformarse por diferentes vías; activación de la guanilato ciclasa soluble, interacción con tioles de proteínas y aminos secundarias, oxidación a nitrito en presencia de oxígeno, inactivación a nitrato a través de la oxihemoglobina o de la interacción con los aniones superóxido para producir peroxinitrito, que se descompone a nitrato. Dado que los aductos nitrosos son más difíciles de medir se ha generalizado la determinación de nitrato y nitrito como marcadores indirectos

de la biodisponibilidad de NO, principalmente debido a su estabilidad química y vida media relativamente larga⁴¹⁶.

Algunos autores realizan esta estimación del NO a través de la determinación del nitrato en orina^{417,418}, sin embargo, esta opción puede ser menos adecuada que la determinación en plasma. Por una parte, los estudios realizados mediante la inhalación de ¹⁵NO en humanos demuestran que se excreta alrededor de un 70% en forma de ¹⁵NO₃ en las 24 horas posteriores al inicio de la inhalación y que, por tanto, una parte importante del NO no se excreta en forma de nitrato⁴¹⁹. Por otro lado, la vida media del nitrato en plasma es de aproximadamente 6-7 horas, por lo que la concentración plasmática de nitrato sería un reflejo más fiel del NO producido en el periodo previo al momento de la extracción, ya que en condiciones fisiológicas y de ayuno, el nitrito representa el 80% de la actividad de la eNOS⁴²⁰.

La dieta convencional puede ser la principal fuente de nitrito y nitrato en el plasma^{421,422}. Los vegetales y los productos cárnicos, el agua potable y las bebidas en general, contienen cantidades mucho más grandes de nitritos y nitratos que las del NO producido de forma endógena, y son fácilmente absorbidos en el intestino delgado⁴²³. Además, el tiempo requerido para que el nitrito y nitrato exógenos puedan ser completamente excretados en la orina varía de 12 horas a 3 días, dependiendo de la cantidad ingerida y de la función renal. Sin embargo, en individuos sanos que consumen una dieta baja en nitrito y nitrato (210 mmol/día), aproximadamente el 50% del nitrato de la orina provendrá de la síntesis de NO a partir de L-arginina en el organismo⁴²⁴. Cuando la dieta es pobre en nitrito y nitrato, la concentración plasmática de nitrito puede servir como un indicador válido de la síntesis de NO por la eNOS, mientras que la excreción urinaria de nitrato refleja la síntesis de NO en todo el organismo⁴²⁵. Por otra parte, existe cierta evidencia⁴²⁰ de que después de un ayuno de 12 horas las concentraciones plasmáticas de nitritos y nitratos pueden alcanzar un estado estacionario en individuos sanos que han consumido una dieta previa con bajo contenido de nitritos y nitratos. La concentración de NO expresada a través de la determinación de nitratos y nitritos se encuentra entre 41 ± 16 $\mu\text{mol/L}$ en ausencia de esa dieta y 19 ± 4 $\mu\text{mol/L}$ tras la dieta⁴²².

Una limitación del estudio realizado es que no fue posible realizar una dieta restrictiva en nitratos y nitritos en los días previos a las pruebas y es posible que el ayuno de 8 horas no haya sido suficiente para alcanzar el estado estacionario. Así, las concentraciones pre-ejercicio de NO_x de los deportistas participantes son similares a los de individuos que no han seguido una dieta exenta y la comparación de los valores basales a lo largo de la temporada o entre los grupos puede no resultar adecuada. No obstante, esto no invalida la estimación del cambio observado con el ejercicio agudo en las concentraciones de NO_x y, al igual que en la mayoría de los marcadores estudiados, se observaba una asociación negativa con las concentraciones pre-ejercicio.

A los 30 minutos de la finalización de las pruebas, se observaba un incremento en las concentraciones séricas de NO_x en respuesta al ejercicio físico agudo que era independiente del nivel de entrenamiento alcanzado a lo largo de la temporada y del tipo de ejercicio realizado. Esta elevación

del NO_x con el ejercicio agudo ha sido descrita también por otros autores, tanto en individuos entrenados, como no entrenados^{418,426,427,428,429}. La mayoría observaron aumentos significativos, desde el primer minuto posterior a la finalización⁴²⁹, hasta la hora⁴²⁷, las 6 horas⁴²⁹ y las 24-48 horas post-ejercicio en atletas^{427,429}, aunque en individuos no entrenados volvían a los valores basales a las 24 horas⁴²⁷. Sin embargo, otros no observaban elevaciones de NO_x tras el ejercicio agudo^{426,430,431}. Esta disparidad podría estar relacionada con la intensidad del ejercicio realizado, ya que Guzel *et al.*⁴²⁹ encontraron diferencias en el comportamiento tras un ejercicio de resistencia en dos grupos de individuos sedentarios a diferentes intensidades, en el que no observaron elevación de los niveles de NO_x en el grupo de menor intensidad.

La elevación del NO con el ejercicio agudo produciría una respuesta de vasodilatación⁴³², además de la relajación de las células musculares lisas, de la disminución de la agregación plaquetaria, permeabilidad vascular... Parece probable que el mecanismo por el cual se produce este incremento esté relacionado directamente con la respuesta fisiológica al aumento del flujo sanguíneo a través de los vasos, por el estímulo mecánico que provoca sobre la pared vascular (fuerzas de cizallamiento)^{11,16,433,434}. Cooke *et al.*⁴³⁵ han sugerido que esta liberación de NO mediada por el flujo es dependiente de la activación de un canal de potasio endotelial que actúa como transductor del estímulo. El estrés mecánico producido por estas fuerzas es el principal estímulo para la producción de NO, con la finalidad de aumentar el diámetro del vaso sanguíneo durante el ejercicio agudo⁴³⁶, lo que produciría una redistribución sistémica de la sangre que podría ser dependiente de la intensidad del ejercicio y del tamaño de la masa muscular implicada. Sin embargo, la elevación observada, porcentualmente la más importante de todos los FRC estudiados, es similar en ambos grupos de deportistas.

Por otra parte, no se observaba una relación entre la variación de las concentraciones de creatinina y de NO_x en ninguno de los dos momentos de la temporada de entrenamiento, lo que parece excluir a la función renal como causa del incremento de NO_x durante el ejercicio. A esta misma conclusión llegaron Jungersten *et al.*⁴¹⁸ en un estudio realizado en un grupo de individuos que incluía tanto sujetos entrenados como no entrenados, en los que descartaron que el aumento de NO_x inducido por el ejercicio estuviese favorecido por una disminución en la tasa de excreción de nitrato, sino que parecía estar relacionado con una mayor tasa de formación de NO de aproximadamente el 80%. El aumento global de producción en nuestro caso sería ligeramente menor (un 54%) aunque en el caso de los ciclistas en temporada alta se alcanzaron cifras equivalentes. Sin embargo, no es posible descartar la influencia de la ingesta de alimentos o bebida en estos deportistas durante la prueba, que en este caso se llevó a cabo en una competición real de más de 3 horas, aunque siendo así serían de esperar valores más extremos.

Bradley *et al.*⁴³⁷ observaron que durante un ejercicio aeróbico en un cicloergómetro la infusión en la arteria femoral de un inhibidor de la eNOS (NMMA), redujo la captación de glucosa en el músculo esquelético en un 48% comparado con la infusión de una solución salina de control. En

modelos animales se ha observado también que el NO interviene en la regulación del metabolismo músculo-esquelético favoreciendo la captación celular de glucosa⁴³⁸. Los mecanismos exactos que explicarían esta captación de glucosa mediada por el NO no están totalmente aclarados, aunque parece que actúan de forma independiente y paralela a los mecanismos inducidos por la insulina⁴³⁹. Sin embargo, en los deportistas estudiados no se demostró una relación inversa entre los cambios en la concentración de NO_x o de las metilargininas inhibitoras de la eNOS tras el ejercicio agudo y los de la glucosa a lo largo de la temporada de entrenamiento.

La disponibilidad de L-arginina es otro factor importante a tener en cuenta ya que determina la producción de NO. Esta producción de NO a partir de la arginina puede inhibirse por la acción de los derivados de la L-arginina, NMMA y del ADMA, que actúan como antagonistas competitivos de la NOS. En nuestro estudio las concentraciones de L-arginina y L-citrulina se incrementaban tras la prueba física con independencia del momento de la temporada, de forma que la biodisponibilidad del precursor del NO en las células endoteliales no debería estar comprometida. En los piragüistas el incremento medio de los niveles de L-arginina con el ejercicio agudo fue mayor que en los ciclistas, debido principalmente al mayor incremento observado en este grupo en temporada alta. En cualquier caso, el aumento de la L-arginina con el ejercicio es similar al observado por otros autores que describen elevaciones que van desde <20%⁴⁴⁰ a 35-45%⁴⁴¹. En otro estudio realizado en ciclistas profesionales⁴²⁶ se determinaron los efectos del ejercicio intenso en las concentraciones plasmáticas de L-arginina y L-citrulina a las 3 horas de la participación en una competición observando para la L-arginina unas concentraciones similares a las basales mientras que las de L-citrulina disminuían. Sin embargo, es probable que el prolongado periodo de reposo previo a la toma de muestra implique unos cambios adaptativos diferentes a los directos del ejercicio agudo. Por otra parte, el tipo de deporte parecía condicionar los niveles basales de los aminoácidos y del cociente arginina/ADMA, observándose concentraciones más elevadas en los piragüistas. Sin embargo, no es posible descartar que estas diferencias estén relacionadas con las diferencias en la alimentación que, según el deporte, demandarían diferentes requerimientos dietéticos.

Las fuentes celulares de L-arginina incluyen la captación transmembrana y, en menor medida, la proteólisis intracelular y, entre otros destinos, sufre la conversión en NO y citrulina por la NOS. Se ha demostrado que la citrulina producida por la eNOS puede ser reciclada en arginina en las células endoteliales a través del ciclo arginina-citrulina⁴⁴². En condiciones de máxima estimulación de la producción de NO, más del 80% de la L-citrulina generada, se reciclaría a la L-arginina⁴⁴³. La citrulina a su vez puede derivarse de otras dos fuentes: del ADMA a través de DDAH y de la ornitina a través de catabolismo de la prolina o la glutamina/glutamato⁴⁴⁴. Dado que las variaciones de la L-arginina y L-citrulina plasmáticas no se asociaban con las del ADMA en el post-ejercicio, la elevación de L-arginina, que puede antagonizar la acción inhibitora del ADMA, elevaba el ratio arginina/ADMA de forma proporcional a los niveles de L-arginina y, por tanto, podrá asegurar el aumento de la producción de NO a través de la eNOS.

Se han llevado a cabo numerosos estudios en una gran variedad de poblaciones al objeto de proporcionar una mayor comprensión sobre papel de ADMA como un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular. La concentración de ADMA varía con la edad⁴⁵⁴ y en mujeres postmenopáusicas⁴⁶². Se han descrito elevaciones plasmáticas de ADMA en pacientes con insuficiencia renal⁴⁴⁵, hipercolesterolemia¹⁶², hipertensión arterial⁴⁴⁶, enfermedad coronaria¹⁵⁸ arteriosclerosis sistémica¹⁶³, insuficiencia cardíaca crónica⁴⁴⁷, diabetes mellitus⁴⁴⁸, preeclampsia⁴⁴⁹, en pacientes en estado crítico⁴⁵⁰ y en la disfunción eréctil⁴⁵¹. También se ha relacionado con otros factores de riesgo como la obesidad, demostrándose que la pérdida de peso disminuye las concentraciones de ADMA⁴⁵². Sin embargo, la contribución del ejercicio físico, tanto agudo como regular, a la regulación de los niveles plasmáticos de ADMA en individuos sanos apenas ha recibido atención hasta el momento.

Para el análisis de estos análogos fisiológicos de la arginina, se llevó a cabo la optimización de un método cromatográfico en fase reversa, empleando como reactivo derivatizante AccQ y como estándar interno N-PLA, el cual proporcionaba una precisión aceptable para el ADMA y SDMA, aunque claramente inferior para el NMMA debido a la baja sensibilidad analítica para esta molécula. Los CV interensayo para ADMA (8,6%) y SDMA (6,8%) son similares a los descritos en la literatura para los métodos HPLC, que varían entre el 2% y el 10%^{303-305,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463}. Así mismo, los valores de concentración de NMMA, ADMA y SDMA son similares a los descritos por otros autores⁴⁵³⁻⁴⁵⁷ en individuos sanos como, por ejemplo, los publicados por Heresztyn *et al.*³⁰³ para el ADMA ($0,44 \pm 0,08 \mu\text{M}$) y el SDMA ($0,42 \pm 0,09 \mu\text{M}$) o por otros autores⁴⁵⁵ para el NMMA ($0,177 \pm 0,041 \mu\text{M}$) que referían CV cercanos al 10%.

Nuestros resultados revelaban que el ejercicio agudo producía un aumento significativo del SDMA a los 30 minutos de la realización de la prueba, con independencia del tipo de ejercicio y del momento de la temporada, sin embargo, no ejercía influencia en la concentración plasmática de NMMA o ADMA, reduciéndose consecuentemente el ratio ADMA/SDMA. Por el contrario, un mayor nivel de entrenamiento producía una disminución significativa de las concentraciones pre-ejercicio de ADMA y SDMA, si afectar a la relación ADMA/SDMA. El efecto del ejercicio agudo en la concentración de ADMA sólo ha sido evaluado en dos trabajos publicados recientemente. Reinecke *et al.*⁴⁶⁴ en el que estudiaron un grupo de 43 pacientes con enfermedad renal poliquística con el objetivo de evaluar el efecto del ejercicio en los niveles de NO y ADMA en pacientes normotensos sedentarios con esta patología, mientras que como grupo control utilizaron 30 individuos sanos, no obesos y sedentarios. Los participantes realizaron una prueba consistente en una sesión de 20 minutos en un cicloergómetro a una intensidad moderada según el VO_2 y observaron que la concentración de ADMA disminuía y la de NO_x aumentaba tras la finalización del ejercicio en el grupo control pero no en los pacientes. Por otra parte, Riccioni *et al.*⁴⁶⁵ observaron concentraciones plasmáticas de ADMA y SDMA más bajas después de una prueba física en 30 pacientes con enfermedad arterial coronaria con una edad media de 52 años. La diferencia con nuestros resultados en el ADMA podría explicarse por

la selección de individuos sedentarios en el grupo control de sanos y por la edad de los pacientes, además de que se desconoce el tiempo en el que se realizó la extracción de sangre tras las pruebas que, como se ha visto en otros marcadores metabólicos, puede ser importante a la hora de valorar el efecto del ejercicio agudo.

El efecto de la actividad física regular en forma de entrenamiento sobre las concentraciones de ADMA ha sido valorado recientemente en diferentes patologías como en pacientes trasplantados renales²⁹², en mujeres postmenopáusicas^{293,294}, en la obesidad²⁹⁵, en la enfermedad arterial periférica²⁹⁷, en pacientes con riesgo elevado de enfermedad coronaria²⁹⁸ y en la diabetes mellitus²⁹⁹. En todos ellos observaban una disminución de la concentración de ADMA tras la participación en un programa de entrenamiento basado en ejercicios aeróbicos que iban desde las 12 semanas^{294,295,298} a los 4 ó 6 meses^{292,297,299}. En dos de estos estudios utilizaron un grupo control de individuos que no llevaban a cabo un programa de entrenamiento en los cuales no se observaba variación en la concentración de ADMA^{294,298}. Un estudio publicado por Hannsen *et al.*⁴⁶⁶ investigó el efecto del ejercicio regular sobre el diámetro de los vasos de la retina en corredores delgados y obesos, incluyendo grupos de 15 individuos obesos, 14 atletas aficionados y 17 atletas de élite que participaron en un programa de entrenamientos de 10 semanas. Observaron un aumento de la expresión del mRNA de la DDAH en células mononucleares aisladas de sangre periférica en todos los grupos tras el entrenamiento, sin embargo, esto producía una disminución de la concentración plasmática de ADMA solo en el grupo de obesos. Por otro lado, existen evidencias de que un aumento de la homocisteína podría causar una inhibición de la DDAH originando un incremento de ADMA¹⁶⁰, sin embargo, la estabilidad observada en las concentraciones plasmáticas del ADMA tras el ejercicio agudo junto con la falta de correlación con los cambios en la homocisteína parece indicar que el efecto del ejercicio sobre los niveles de metilargininas no estaría relacionado directamente con la actividad del enzima DDAH.

Los niveles de metilargininas se regulan a través de dos enzimas, las PRMTs y la DDAH. Todas ellas derivan de la proteólisis de los residuos de arginina metilados por las PRMTs y además, el ADMA y el NMMA pueden degradarse a citrulina y mono o dimetilaminas por la DDAH. La producción de metilargininas puede elevarse por una regulación positiva de las PRMTs o por una mayor actividad proteolítica que aumentará su concentración intracelular, de manera que si el sistema de transporte transmembrana CAT no está saturado, se estimulará su exportación extracelular elevando la concentración plasmática⁴⁶⁷. Del mismo modo, un descenso en la actividad de la DDAH incrementará los niveles de ADMA y NMMA, tanto intra como extracelularmente. Por el contrario, un descenso en la expresión o una inhibición de las CAT, decelerará la salida de metilargininas incrementando la concentración intracelular y disminuyendo la extracelular. Así, el análisis de estos metabolitos en sangre puede dar información sobre el mecanismo involucrado en los posibles cambios producidos por el ejercicio y el entrenamiento. Sin embargo, debido a que el SDMA no es un sustrato de la DDAH, su producción se ve afectada por los cambios en la metilación/proteólisis de las proteínas y en la actividad de las CAT pero no por los cambios en la actividad de la DDAH. Además, a

diferencia del ADMA de la que sólo una pequeña cantidad es eliminada por el riñón, la principal vía de eliminación del SDMA del organismo es la excreción urinaria¹⁵⁷. Por lo tanto, una reducción de la actividad de la DDAH se traduciría en un aumento de la relación de ADMA/SDMA mientras que su activación o un cambio en la eficiencia de la función renal daría lugar a un descenso del ratio.

Los resultados obtenidos mostraron que el descenso del ratio ADMA/SDMA con el ejercicio agudo estaba asociado al aumento de la concentración de SDMA cuya causa podría ser la reducción temporal del flujo sanguíneo renal y de la tasa de filtración glomerular³⁴⁶ que ocurre con el ejercicio, sin embargo, no se demostraba una asociación entre los aumentos de las concentraciones plasmáticas de creatinina y de SDMA. Los cambios generalizados en la metilación de las proteínas o en la actividad proteolítica no afectarían a la relación ADMA/SDMA, como también la activación/desactivación de las CAT afectaría por igual a las concentraciones de ADMA y de SDMA. Los restos de arginina de las proteínas se metilan asimétricamente por las isoformas de clase 1 de las PRMTs y simétricamente por isoformas de clase 2, por lo tanto, la disminución de la relación ADMA/SDMA también podría estar reflejando cambios relativos en la actividad de ambas isoformas, sin embargo, este proceso debería ir acompañado de una elevación paralela de la producción de NMMA que no se observa en nuestros deportistas ya que tanto las PRMTs de clase 1 como las de clase 2 dan lugar a NMMA, aunque no puede descartarse totalmente dada la baja sensibilidad del método analítico para esta magnitud.

Los mecanismos subyacentes a la disminución de la concentración plasmática de ADMA con el entrenamiento no han sido dilucidados, pero se han relacionado con una mayor expresión de DDAH⁴⁶⁶. Sin embargo, en nuestro estudio, el hallazgo de que la disminución de la concentración de ADMA con el entrenamiento se acompañaba de una disminución paralela de SDMA, manteniendo constante del ratio ADMA/SDMA a lo largo de la temporada parece apuntar a un descenso adaptativo en la actividad proteolítica, en la actividad de las PRMTs o en la actividad de las CAT.

Conclusiones

1. La selección del grupo experimental de deportistas ha permitido minimizar la posible influencia de variables fisiológicas o relacionadas con los hábitos de vida de los individuos. La comparación de ambos grupos de deportistas con respecto a los datos antropométricos mostraba diferencias muy significativas que, sin embargo, no afectaban a la magnitud de los cambios metabólicos con el ejercicio agudo observados para la mayoría de los FRC estudiados.
2. El tipo de ejercicio realizado no inducía diferencias en la variación del volumen plasmático observada a los 30 minutos de la prueba de esfuerzo aunque el nivel de entrenamiento parecía influir en la magnitud de ese cambio, siendo este menor en el momento de la temporada en que los deportistas estaban sometidos a entrenamientos de más elevada intensidad.
3. Tras el ejercicio se observaba un aumento en suero de las magnitudes generales estudiadas que, además de los mecanismos particulares que puedan afectar a cada una de ellas, puede tener un promotor común en los cambios adaptativos que ocurren en la función renal, al menos para la creatinina, el urato y las proteínas/albumina, dada la asociación observada en estos cambios a lo largo de la temporada.
4. La respuesta incremental al ejercicio agudo en los marcadores lipídicos de riesgo cardiovascular tradicionales era independiente del tipo de ejercicio y del nivel de entrenamiento, un comportamiento que se ve reflejado también en los marcadores de tipo emergente, como las apolipoproteínas A y B. En cambio, el ejercicio y el entrenamiento no causaban efectos significativos en los niveles séricos de la lipoproteína (a).
5. Los deportistas mostraban una débil respuesta inflamatoria al ejercicio físico agudo practicado de acuerdo al cambio observado en las concentraciones de PCRus a los 30 minutos de la finalización de las pruebas, el cual era independiente del tipo de ejercicio realizado. Un mayor nivel de entrenamiento parecía atenuar esta respuesta inflamatoria al ejercicio agudo.
6. El aumento de las concentraciones plasmáticas de homocisteína total después del ejercicio estaba relacionado con unas mayores concentraciones de rHcy, presumiblemente inducidas por su exportación celular. Este efecto es independiente del tipo de ejercicio y del nivel de entrenamiento y podría estar relacionado con los cambios en la función renal. Un mayor nivel de entrenamiento no parecía reducir los niveles plasmáticos basales de este aminotiol.
7. El incremento observado en la homocisteína reducida tras las pruebas era proporcionalmente menor que el de la homocisteína total, lo que daba lugar a un descenso en la relación de concentraciones. Este cambio en el ratio rHcy/tHcy refleja probablemente una situación de estrés oxidativo, con acumulación de la fracción unida

a proteínas que por su más lenta eliminación explicaría también la elevación de la tHcy observada habitualmente en el ejercicio.

8. A los 30 minutos de la finalización de las pruebas, se observaba un incremento en las concentraciones séricas de NO, en forma de nitritos y nitratos, en respuesta al ejercicio físico agudo que era independiente del tipo de ejercicio y del nivel de entrenamiento. Además, el aumento correspondiente que se observaba en las concentraciones de L-arginina y L-citrulina puede asegurar que la biodisponibilidad del precursor del NO en las células endoteliales no esté comprometida.
9. El ejercicio únicamente elevaba las concentraciones de SDMA tras la realización de las pruebas, con independencia del deporte y del momento de la temporada, mientras que un mayor nivel de entrenamiento reducía las concentraciones pre-ejercicio de ADMA y SDMA, si afectar a la relación ADMA/SDMA. Puesto que la eliminación de ambas metilargininas está regulada por mecanismos diferentes, este efecto beneficioso del entrenamiento sobre el ADMA puede estar relacionado con un descenso en su producción.

El desarrollo del trabajo de investigación realizado para la presentación de esta tesis doctoral ha dado lugar a un trabajo titulado “*Nuevos efectos del ejercicio físico y del entrenamiento en los factores de riesgo cardiovascular emergentes*”, premiado con el tercer puesto en el “*XII Premio Nacional de investigación en Medicina del Deporte*” otorgado por la Escuela de Medicina del Deporte y la Universidad de Oviedo en abril de 2010, así como a las siguientes publicaciones, que se adjuntan en el Anexo I de la presente memoria:

Venta R, Cruz E, Valcárcel G, Terrados N. Plasma Vitamins, Amino Acids, and Renal Function in Postexercise Hyperhomocysteinemia. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(8):1645-51.

Terrados N, Valcárcel G, Venta R. New cardiovascular risk factors and physical activity. *Apunts Med Esport.* 2010;45(167):201-8.

Bibliografía

¹ Organización Mundial de la Salud [Internet]. Centro de prensa nota descriptiva n°310; 2014 [consulta el 7 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>.

² Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, Donado Campos J, Rodríguez Artalejo F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, 2007.

³ Instituto Nacional de Estadística [Internet]. Madrid: Instituto Nacional de Estadística; c2015. Defunciones según la acusa de muerte; 27 Feb 2015 [citado 7 Abr 2015]. Disponible en: <http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p417/&file=inebase>.

⁴ Pedro-Botet J, Jericó C. Etiopatogenia de la arteriosclerosis. Aspectos celulares y moleculares del daño vascular. *Aten Primaria*. 2004;34(Supl 2):10-8.

⁵ Sugamura K, Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(5):978-92.

⁶ Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. 2006;174(6):801-9.

⁷ Fletcher GF, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Falls H, Froelicher ES, Froelicher VF, Pina IL. Position statement: statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. *Circulation*. 1992;86(1):340-4.

⁸ Fletcher GF, Balady G, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Froelicher ESS, Froelicher VF, Pina IL, Pollock ML. Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans: a statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*. 1996;94(4):857-62.

⁹ Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*. 1999;100(13):1481-92.

¹⁰ Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Gibbons LW. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA*. 1996;276(3):205-10.

- ¹¹ Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003;107(25):3152-8.
- ¹² Martin JE, Dubbert PM, Cushman WC. Controlled trial of aerobic exercise in hypertension. *Circulation*. 1990;81(5):1560-7.
- ¹³ Duncan JJ, Farr R, Upton SJ, Hagan RD, Oglesby ME, Blair SN. The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in patients with mild essential hypertension. *JAMA*. 1985;254(18):2609-13.
- ¹⁴ Wood PD, Stefanick ML, Williams PT, Haskell WL. The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women. *N Eng J Med*. 1991;325(7):461-6.
- ¹⁵ Helmrich SP, Ragland D, Leung RW, Paffenbarger RS Jr. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med*. 1991;325(3):147-52.
- ¹⁶ Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(7):1652-60.
- ¹⁷ Torres-Gárate, Álvarez-Rodríguez E, Calvo Manuel E. Historia natural de la arteriosclerosis. Expresividad clínica. Complicaciones agudas y crónicas. *Medicine* 2005;9(38):2525-35.
- ¹⁸ Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. Mexico D.F.: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2001.
- ¹⁹ Badimón L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55(Suppl 1):17-26.
- ²⁰ American College of Sports Medicine. *Manual de consulta para el control y la prescripción de ejercicio*. Badalona: Editorial Paidotribo; 2008.
- ²¹ Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*. 2004;32(Suppl 5):S271-9.
- ²² Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
- ²³ Sabán Ruiz J. *Control global del riesgo cardiometabólico*. Madrid: Ediciones Diaz de Santos; 2009.

- ²⁴ Fuster V, Ambrose JA, Ross R, Topol EJ. Arteriosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Berlin: Springer Science & Business; 1997.
- ²⁵ Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39(4):287-324.
- ²⁶ Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91(9):2488-96.
- ²⁷ Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* 2001;104(4):503-16.
- ²⁸ Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Eng J Med.* 1999;340(2):115-26.
- ²⁹ Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteínas, plaquetas y aterotrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(10):1161-78.
- ³⁰ Mangas Rojas A, Toro Cebada R, Santi Cano MJ, Barba Chacón A. Arteriosclerosis. Patogenia de la arteriosclerosis. Mecanismos celulares y moleculares implicados en la aterogénesis. *Medicine* 2005;9(38):2495-505.
- ³¹ Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155(1):1-5.
- ³² Borén J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest.* 1998 Jun 15;101(12):2658-64.
- ³³ Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
- ³⁴ Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?. *J Clin Invest.* 2001;107(3):255-64.
- ³⁵ Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993;69(5):377-81.
- ³⁶ Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10):1859-67.

- ³⁷ Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1961;55:33-50.
- ³⁸ Dawber TR, Meadors GF, Moore FE Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951;41(3):279-81.
- ³⁹ Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factors categories. *Circulation.* 1998;97(18):1837-47.
- ⁴⁰ 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 Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285(19):2486-97.
- ⁴¹ National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
- ⁴² De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Manger Cats V, Orth-Gomér K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D; Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J.* 2003;24(17):1601-10.
- ⁴³ Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, Greenland P, Lackland DT, Levy D, O'Donnell CJ, Robinson JG, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Sorlie P, Stone NJ, Wilson PW, Jordan HS, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 2014;129(25 Suppl 2):S49-73.

⁴⁴ Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH, Goldberg AC, Gordon D, Levy D, Lloyd-Jones DM, McBride P, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC Jr, Watson K, Wilson PW, Eddleman KM, Jarrett NM, LaBresh K, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S1-45.

⁴⁵ Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, de Jesus JM, Houston Miller N, Hubbard VS, Lee IM, Lichtenstein AH, Loria CM, Millen BE, Nonas CA, Sacks FM, Smith SC Jr, Svetkey LP, Wadden TA, Yanovski SZ, Kendall KA, Morgan LC, Trisolini MG, Velasco G, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Smith SC Jr, Tomaselli GF; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S76-99.

⁴⁶ European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(6):1011-53.

⁴⁷ Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syvanne M, Scholte Op Reimer WJM, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. Guía europea sobre prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica (versión 2012). *Rev Esp Cardiol*. 2012;65:937.e1-e66.

⁴⁸ Lee IM, Skerrett PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation?. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jun;33(6 Suppl):S459-71.

⁴⁹ Marcus BH, Williams DM, Dubbert PM, Sallis JF, King AC, Yancey AK, Franklin BA, Buchner D, Daniels SR, Claytor RP; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity); American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young; Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. Physical activity intervention studies: what we know and what we need to know:

a scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity); Council on Cardiovascular Disease in the Young; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. *Circulation*. 2006;114(24):2739-52.

⁵⁰ Soriguer F, Rojo Martínez G, Esteva I, Ruiz De Adana MS, Catalá M, Merelo MJ, Tinahones F, Cardona F, Dobarganes C, Cuesta AL, Beltrán M, García Almeida JM, Gómez Zumaquero JM, Morcillo S, García Fuentes E. Actividad física y factores de riesgo cardiovascular y metabólico en la población general. *Med Clin (Barc)*. 2003;121(15):565-9.

⁵¹ Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-52.

⁵² James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC Jr, Svetkey LP, Taler SJ, Townsend RR, Wright JT Jr, Narva AS, Ortiz E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507-20.

⁵³ MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*. 1990;335(8692):765-74.

⁵⁴ Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, Bulpitt CJ, de Leeuw PW, Dollery CT, Fletcher AE, Forette F, Leonetti G, Nachev C, O'Brien ET, Rosenfeld J, Rodicio JL, Tuomilehto J, Zanchetti A. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet* 1997;350(9080):757-64.

⁵⁵ Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham Heart Study. *Circulation*. 1999;100(4):354-60.

- ⁵⁶ American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36 Suppl 1:S67-74.
- ⁵⁷ Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study. *JAMA*. 1979;241(19):2035-8.
- ⁵⁸ Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis*. 1998;137(Suppl 1):S65-73.
- ⁵⁹ Haffner SM, Letho S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type II diabetes and non diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998;339(4):229-33.
- ⁶⁰ Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*. 2004;110(2):227-39.
- ⁶¹ Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *JAMA*. 2003;290:891-7.
- ⁶² Stamler J, Wentworth DN, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356.222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) *JAMA*. 1986;256(20):2823-8.
- ⁶³ Henry JB. *Laboratorio en el diagnóstico clínico*. 20ª ed. Madrid; Marbán: 2007.
- ⁶⁴ Berg JM, Stryer L, Tymoczko J, Macarulla JM. *Bioquímica*. Barcelona: Reverte; 2008.
- ⁶⁵ Pocovi Mieras M, Mozas Alonso P, Cía Gómez P. Hiperlipidemias: concepto, clasificación y mecanismo etiopatogénico. *Hiperlipidemias primarias*. *Medicine*. 2004;9(18):1089-104.
- ⁶⁶ Grundy SM. Primary prevention of coronary heart disease: integrating risk assessment with intervention. *Circulation*. 1999;100(9):988-98.
- ⁶⁷ Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. Chicago; Lippincott Williams & Wilkins: 2004.

- ⁶⁸ Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79(1):8-15.
- ⁶⁹ Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE, Rackley CE. Usefulness of the total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol ratio in predicting angiographic coronary artery disease in women. *Am J Cardiol*. 1991;68(17):1646-50.
- ⁷⁰ Kinoshita B, Glick H, Preiss L, Puder KL. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks in men by changes in levels and ratios. *J Investig Med*. 1995;43(5):443-50.
- ⁷¹ Pintó X, Ros E. Lípidos séricos y predicción del riesgo cardiovascular: importancia de los cocientes colesterol total/colesterol HDL y colesterol LDL/colesterol HDL. *Clin Invest Arterioscl*. 2000;12(5):267-84.
- ⁷² Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 1998;81(4A):18B-25B.
- ⁷³ Rubiés-Prat J, Pedro-Botet J. Hipertrigliceridemia como factor de riesgo cardiovascular. ¿Fin de la controversia? *Med Clin (Barc)*. 2003;120(8):303-7.
- ⁷⁴ Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 1998;81(4A):7B-12B.
- ⁷⁵ Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J*. 1998;19(Suppl M):M8-M14.
- ⁷⁶ Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults - the evidence report. *Obesity Res*. 1998;6(Suppl 2):51S-209S.
- ⁷⁷ Tornvall P, Bavenholm P, Landou C, de Faire U, Hamsten A. Relation of plasma levels and composition of apolipoprotein B-containing lipoproteins to angiographically defined coronary artery disease in young patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1993;88(5 Pt 1):2180-9.
- ⁷⁸ Sniderman AD. Apolipoprotein B and apolipoprotein AI as predictors of coronary artery disease. *Can J Cardiol*. 1988;4(Suppl A):24A-30A.
- ⁷⁹ Sedlis SP, Schechtman KB, Ludbrook PA, Sobel BE, Schonfeld G. Plasma apoproteins and the severity of coronary artery disease. *Circulation*. 1986;73(5):978-86.

- ⁸⁰ Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *J Intern Med.* 2004;255(2):188-205.
- ⁸¹ Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, Holme I, Furberg CD, Sniderman AD. The apoB/apoA-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(12):1355-63.
- ⁸² Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy--a review of the evidence. *J Intern Med.* 2006;259(5):493-519.
- ⁸³ Moliterno DJ, Lange RA, Meidell RS, Willard JE, Leffert CC, Gerard RD, Boerwinkle E, Hobbs HH, Hillis LD. Relation of plasma lipoprotein(a) to infarct artery patency in survivors of myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88(3):935-40.
- ⁸⁴ Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PWF, Castelli WP, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin Chem.* 1999;45(7):1039-46.
- ⁸⁵ Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science.* 1989;246(4932):904-10.
- ⁸⁶ Maher VM, Brown BG, Marcovina SM, Hillger LA, Zhao XQ, Albers JJ. Effects of lowering elevated LDL cholesterol on the cardiovascular risk of lipoprotein(a). *JAMA.* 1995;274(22):1771-4.
- ⁸⁷ Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest.* 1992;90(1):52-60.
- ⁸⁸ Herrera E, Álvarez JJ, Lasunción MA. Metabolismo y fisiopatología de la lipoproteína (a). *Nutr Clin.* 1993;13(1):7-24.
- ⁸⁹ Rubiés-Prat J. Lipoproteína (a): del genotipo al riesgo cardiovascular, pasando por el fenotipo. *Clin Invest Arterioscler.* 2004;16:151-3.
- ⁹⁰ Moeslinger T, Fiedl R, Volf I, Brunner M, Koller E, Spieckermann PG. Inhibition of nitric oxide synthesis by oxidized lipoprotein (a) in a murine cell line. *FEBS Lett.* 2000;478(1-2):95-9.
- ⁹¹ Von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G. Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(2):434-9.

- ⁹² Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetière P, Jousilahti P, Keil U, Njølstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM; SCORE project group. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987-1003.
- ⁹³ Nishino M, Malloy MJ, Naya-Vigne J, Russell J, Kane JP, Redberg RF. Lack of association of lipoprotein(a) levels with coronary calcium deposits in asymptomatic postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(2):314-20.
- ⁹⁴ Moliterno DJ, Jokinen EV, Miserez AR, Lange RA, Willard JE, Boerwinkle E, Hillis LD, Hobbs HH. No association between plasma lipoprotein(a) concentrations and the presence or absence of coronary atherosclerosis in African Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(7):850-5.
- ⁹⁵ Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on lipoprotein(a) and cardiovascular disease: recent advances and future directions. *Clin Chem*. 2003;49(11):1785-96.
- ⁹⁶ Esteban Salán M, Aguilar Doreste JA, Gómez Gerique JA, Romero Román C, Castro Castro MJ, Calmarza Calmarza P, Arrobas Velilla T, Cándas Estebáñez B (Comisión de Lipoproteínas y Enfermedades Vasculares). Lipoproteína (a): factor de riesgo emergente de enfermedad cardiovascular Documentos de la SEQC. 2013;6:39-46.
- ⁹⁷ Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342(12):836-43.
- ⁹⁸ Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2004;6(2):131-9.
- ⁹⁹ Healy H, Westhuyzen J. Biology and relevance of C-reactive protein in cardiovascular and renal disease. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30(2):133-43.
- ¹⁰⁰ Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499-511.

- ¹⁰¹ Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA*. 1995;274(19):1526-33.
- ¹⁰² Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16(5):1114-9.
- ¹⁰³ Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, Tishler PV, Hennekens CH. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA*. 1992;268(7):877-81.
- ¹⁰⁴ Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*. 1998;49:31-62.
- ¹⁰⁵ Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:279-98.
- ¹⁰⁶ Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation*. 1999;99(1):178-82.
- ¹⁰⁷ Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB, Wilson PWF, Wolf PA. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1999;131(5):352-5.
- ¹⁰⁸ Stehouwer CD, Weijnenberg MP, van den Berg M, Jakobs C, Feskens EJM, Kromhout D. Serum homocysteine and risk of coronary heart disease and cerebrovascular disease in elderly men: a 10-year follow-up. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(12):1895-901.
- ¹⁰⁹ Malinow MR, Stampfer MJ. Role of plasma homocyst(e)ine in arterial occlusive diseases. *Clin Chem*. 1994;40(6):857-8.
- ¹¹⁰ Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and Oxidative Stress. Time for a Reality Check?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1182-4.
- ¹¹¹ Gauthier GM, Keevil JG, McBride PE. The association of homocysteine and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2003;26(12):563-8.

- ¹¹² Jung JM, Kwon do Y, Han C, Jo I, Jo SA, Park MH. Increased carotid intima-media thickness and plasma homocysteine levels predict cardiovascular and all-cause death: a population-based cohort study. *Eur Neurol.* 2013;70(1-2):1-5.
- ¹¹³ Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattström L, Wilcken B, Wilcken DEL, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine and its disulfide derivatives. A suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1704-6.
- ¹¹⁴ Blanco Vaca F. Homocisteína: concentración plasmática de homocisteína y enfermedad cardiovascular. Barcelona: Servei de Bioquímica e Institut de Recerca Hospital; 2003.
- ¹¹⁵ McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 1969;56(1):111-28.
- ¹¹⁶ Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996;98(1):5-7.
- ¹¹⁷ Brattström L, Wilken DEL. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):315-23.
- ¹¹⁸ Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem.* 2004;50(1):3-32.
- ¹¹⁹ Cavalca V, Cighetti G, Bamonti F, Loaldi A, Bortone L, Novembrino C, de Franceschi M, Belardinelli R, Guazzi MD. Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem.* 2001;47(5):887-92.
- ¹²⁰ Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* 1995;41(3):340-2.
- ¹²¹ Ueland PM, Mansoor MA, Guttormsen AB, Müller F, Aukrust P, Refsum H, Svardal AM. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status--a possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J Nutr.* 1996;126(Suppl 4):S1281-4.
- ¹²² Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* 1986;77(4):1370-6.

- ¹²³ Blanco F, Chacón P, Deulofeu R, Dulín E. Homocisteína: 1ª Reunión nacional Segovia 2004. Barcelona: Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular; 2005.
- ¹²⁴ Ueland PM, Vollset SE. Homocysteine and folate in pregnancy. *Clin Chem*. 2004;50(8):1293-5.
- ¹²⁵ Mansoor MA, Bergmark C, Svoldal AM, Lønning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(2):232-40.
- ¹²⁶ Hayward R, Ruangthai R, Karnilaw P, Chicco A, Strange R, McCarty H, Westerlind KC. Attenuation of homocysteine-induced endothelial dysfunction by exercise training. *Pathophysiology*. 2003;9(4):207-14.
- ¹²⁷ Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993;91(1):308-18.
- ¹²⁸ Tsai JC, Wang H, Perrilla MA, Yoshizumi M, Sibinga NE, Tan LC, Haber E, Chang TH, Schlegel R, Lee ME. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1996;97(1):146-53.
- ¹²⁹ Suárez García I, Gómez Cerezo JF, Ríos Blanco JJ, Barbado Hernández FJ, Vázquez Rodríguez JJ. La homocisteína. ¿El factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio?. *An Med Interna*. 2001;18(4):211-7.
- ¹³⁰ Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;2(8567):1057-8.
- ¹³¹ Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1774-7.
- ¹³² Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-42.
- ¹³³ Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003;59(4):824-33.

- ¹³⁴ Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- ¹³⁵ Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
- ¹³⁶ Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(24):9265-9.
- ¹³⁷ Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med*. 1993;329(27):2002-12.
- ¹³⁸ Kooijman M, Thijssen DH, de Groot PC, Bleeker MW, van Kuppevelt HJ, Green DJ, Rongen GA, Smits P, Hopman MT. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *J Physiol*. 2008;586(4):1137-45.
- ¹³⁹ Wray DW, Witman MA, Ives SJ, McDaniel J, Trinity JD, Conklin JD, Supiano MA, Richardson RS. Does brachial artery flow-mediated vasodilation provide a bioassay for NO? *Hypertension*. 2013;62(2):345-51.
- ¹⁴⁰ Green DJ, Dawson EA, Groenewoud HM, Jones H, Thijssen DH. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated?: A meta-analysis. *Hypertension*. 2014;63(2):376-82.
- ¹⁴¹ Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*. 2004;134(Suppl 10):2748S-2751S.
- ¹⁴² Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85(3):342-50.
- ¹⁴³ Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(9):2032-7.
- ¹⁴⁴ Stamler JS, Hausladen A. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol*. 1998;5(4):267-9.
- ¹⁴⁵ Sydow H, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):41-51.
- ¹⁴⁶ Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.

- ¹⁴⁷ Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999;100(14):1515-20.
- ¹⁴⁸ Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Rees DD. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol*. 1989;98(2):646-52.
- ¹⁴⁹ Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992;20(3):298-303.
- ¹⁵⁰ Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992;339(8793):572-5.
- ¹⁵¹ Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):33-40.
- ¹⁵² Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):23-38.
- ¹⁵³ Bedford MT, Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*. 2005;18(3):263-72.
- ¹⁵⁴ Litt M, Qiu Y, Huang S. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep*. 2009;29(2):131-41.
- ¹⁵⁵ Boffa LC, Karn J, Vidali G, Allfrey VG. Distribution of N^G, N^G-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;74(3):969-76.
- ¹⁵⁶ Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res*. 2009;60(6):448-60.
- ¹⁵⁷ De Gennaro Colonna V, Bianchi M, Pascale V, Ferrario P, Morelli F, Pascale W, Tomasoni L, Turiel M. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and a novel cardiovascular risk molecule. *Med Sci Monit*. 2009;15(4):RA91-101.

- ¹⁵⁸ Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, Reinecke H. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1128-34.
- ¹⁵⁹ Zoccali C, Maas R, Cutrupi S, Pizzini P, Finocchiaro P, Cambareri F, Panuccio V, Martorano C, Schulze F, Enia G, Tripepi G, Boger R. Asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) response to inflammation in acute infections. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(3):801-6.
- ¹⁶⁰ Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR, Haynes WG. Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond).* 2001;100(2):159-60.
- ¹⁶¹ Böger RH. Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(11):1467-72.
- ¹⁶² Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 1998;98(18):1842-7.
- ¹⁶³ Böger RH, Bode-Böger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frölich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1997;95(8):2068-74.
- ¹⁶⁴ Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?. *Circulation.* 2004;109(15):1813-8.
- ¹⁶⁵ Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, Laaksonen R. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;358(9299):2127-8.
- ¹⁶⁶ Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.* 2001;358(9299):2113-7.
- ¹⁶⁷ Davids M, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2012;37:10-4.
- ¹⁶⁸ Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(4):1-3.

- ¹⁶⁹ Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003;24(21):1912-9.
- ¹⁷⁰ Meinitzer A, Seelhorst U, Wellnitz B, Halwachs-Baumann G, Boehm BO, Winkelmann BR, März W. Asymmetrical dimethylarginine independently predicts total and cardiovascular mortality in individuals with angiographic coronary artery disease (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study). *Clin Chem.* 2007;53(2):273-83.
- ¹⁷¹ Lundman P, Eriksson MJ, Stühlinger M, Cooke JP, Hamsten A, Tornvall P. Mild-to-moderate hypertriglyceridemia in young men is associated with endothelial dysfunction and increased plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(1):111-6.
- ¹⁷² Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(9):2039-44.
- ¹⁷³ Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation.* 1999;99(9):1141-6.
- ¹⁷⁴ Yasuda S, Miyazaki S, Kanda M, Goto Y, Suzuki M, Harano Y, Nonogi H. Intensive treatment of risk factors in patients with type-2 diabetes mellitus is associated with improvement of endothelial function coupled with a reduction in the levels of plasma asymmetric dimethylarginine and endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Eur Heart J.* 2006;27(10):1159-65.
- ¹⁷⁵ Päivä H, Laakso J, Laine H, Laaksonen R, Knuuti J, Raitakari OT. Plasma asymmetric dimethylarginine and hyperemic myocardial blood flow in young subjects with borderline hypertension or familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(7):1241-7.
- ¹⁷⁶ Bode-Böger SM, Böger RH, Kienke S, Junker W, Frölich JC. Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(2):598-603.
- ¹⁷⁷ Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 1998;53(4):1068-77.
- ¹⁷⁸ Notsu Y, Yano S, Shibata H, Nagai A, Nabika T. Plasma arginine/ADMA ratio as a sensitive risk marker for atherosclerosis: Shimane CoHRE study. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):61-6.

- ¹⁷⁹ Stühlinger MC, Stanger O. Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. *Curr Drug Metab.* 2005;6(1):3-14.
- ¹⁸⁰ Ortega Sánchez-Pinilla R, Jiménez Díaz F. *Medicina del ejercicio físico y del deporte para la atención a la salud.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1992.
- ¹⁸¹ Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 1985;100(2):126-31.
- ¹⁸² Boraita Pérez A. Ejercicio, piedra angular de la prevención cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(5):514-28.
- ¹⁸³ McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiología del ejercicio.* Madrid, Alianza Editorial; 1986.
- ¹⁸⁴ Lagally KM, Robertson RJ, Gallagher KI, Goss FL, Jakicic JM, Lephart SM, McCaw ST, Goodpaster B. Perceived exertion, electromyography, and blood lactate during acute bouts of resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(3):552-9.
- ¹⁸⁵ Fletcher GF, Balady G, Froelicher VF, Hartley LH, Haskell WL, Pollock ML. Exercise standars: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 1995;91(2):580-615.
- ¹⁸⁶ Wilmore JH, Costill DL. *Fisiología del esfuerzo y del deporte.* Barcelona: Editorial Paidotribo; 2004.
- ¹⁸⁷ Viru A, Viru M. *Análisis y control del rendimiento deportivo.* Barcelona: Editorial Paidotribo; 2003.
- ¹⁸⁸ Alexander S. Physiologic and biochemical effects of exercise. *Clin Biochem.* 1984;17(2):126-31.
- ¹⁸⁹ Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222(3):283-92.
- ¹⁹⁰ Carnethon MR, Gidding SS, Nehgme R, Sidney S, Jacobs DR Jr, Liu K. Cardiorespiratory fitness in young adulthood and the development of cardiovascular disease risk factors. *JAMA.* 2003;290(23):3092-100.
- ¹⁹¹ Petruzzello SJ, Landers DM, Hatfield BD, Kubitz KA, Salazar W. A meta-analysis on the anxiety-reducing effects of acute and chronic exercise. Outcomes and mechanisms. *Sports Med.* 1991;11(3):143-82.

- ¹⁹² Vanninen E, Uusitupa M, Siitonen O, Laitinen J, Länsimies E. Habitual physical activity, aerobic capacity and metabolic control in patients with newly-diagnosed Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effect of 1-year diet and exercise intervention. *Diabetologia*. 1992;35(4):340-6.
- ¹⁹³ Weinstein AR, Sesso HD, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Relationship of physical activity vs body mass index with type 2 diabetes in women. *JAMA*. 2004;292(10):1188-94.
- ¹⁹⁴ Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, DuBose KD. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise. A quantitative analysis. *Sports Med*. 2001;31(15):1033-62.
- ¹⁹⁵ Balady GJ. Survival of the fittest-more evidence. *N Engl J Med*. 2002;346(11):852-4.
- ¹⁹⁶ Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*. 1999;99(7):963-72.
- ¹⁹⁷ Banz WJ, Maher MA, Thompson WG, Bassett DR, Moore W, Ashraf M, Keefer DJ, Zemel MB. Effects of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(4):434-40.
- ¹⁹⁸ LeMura LM, von Duvillard SP, Andreacci J, Klebez JM, Chelland SA, Russo J. Lipid and lipoprotein profiles, cardiovascular fitness, body composition, and diet during and after resistance, aerobic and combination training in young women. *Eur J Appl Physiol*. 2000;82(5-6):451-8.
- ¹⁹⁹ O'Donovan G, Owen A, Bird SR, Kearney EM, Nevill AM, Jones DW, Woolf-May K. Changes in cardiorespiratory fitness and coronary heart disease risk factors following 24 wk of moderate- or high-intensity exercise of equal energy cost. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;98(5):1619-25.
- ²⁰⁰ Aadahl M, Kjaer M, Jørgensen T. Associations between overall physical activity level and cardiovascular risk factors in an adult population. *Eur J Epidemiol*. 2007;22(6):369-78.
- ²⁰¹ Aadahl M, von Huth Smith L, Pisinger C, Toft UN, Glümer C, Borch-Johnsen K, Jørgensen T. Five-year change in physical activity is associated with changes in cardiovascular disease risk factors: the Inter99 study. *Prev Med*. 2009;48(4):326-31.
- ²⁰² Calabresi L, Franceschini G. Lecithin:cholesterol acyltransferase, high-density lipoproteins, and atheroprotection in humans. *Trends Cardiovasc Med*. 2010;20(2):50-3.
- ²⁰³ Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, Flynn MM, Chenevert CB, Herbert PN. High density lipoprotein metabolism in endurance athletes and sedentary men. *Circulation*. 1991;84(1):140-52.

- ²⁰⁴ Ruiz Jiménez MA. Factores de riesgo cardiovascular en niños y adolescentes. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2004.
- ²⁰⁵ Lira FS, Yamashita AS, Uchida MC, Zanchi NE, Gualano B, Martins E Jr, Caperuto EC, Seelaender M. Low and moderate, rather than high intensity strength exercise induces benefit regarding plasma lipid profile. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2:31.
- ²⁰⁶ Fett CA, Fett WC, Marchini JS. Circuit weight training vs jogging in metabolic risk factors of overweight/obese women. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(5):519-25.
- ²⁰⁷ Bounds RG, Grandjean PW, O'Brien BC, Inman C, Crouse SF. Diet and short term plasma lipoprotein-lipid changes after exercise in trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2000;10(2):114-27.
- ²⁰⁸ Grandjean PW, Crouse SF, Rohack JJ. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2000;89(2):472-80.
- ²⁰⁹ Goodyear LJ, Van Houten DR, Fronsoe MS, Rocchio ML, Dover EV, Durstine JL. Immediate and delayed effects of marathon running on lipids and lipoproteins in women. *Med Sci Sports Exerc*. 1990;22(5):588-92.
- ²¹⁰ Kantor MA, Cullinane EM, Sady SP, Herbert PN, Thompson PD. Exercise acutely increases high density lipoprotein-cholesterol and lipoprotein lipase activity in trained and untrained men. *Metabolism*. 1987;36(2):188-92.
- ²¹¹ Sgouraki E, Tsopanakis A, Tsopanakis C. Acute exercise: response of HDL-C, LDL-C lipoproteins and HDL-C subfractions levels in selected sport disciplines. *J Sports Med Phys Fitness*. 2001;41(3):386-91.
- ²¹² Hughes RA, Thorland WG, Housh TJ, Johnson GO. The effect of exercise intensity on serum lipoprotein responses. *J Sports Med Phys Fitness*. 1990;30(3):254-60.
- ²¹³ Hill S, Bermingham MA, Knight PK. Lipid metabolism in young men after acute resistance exercise at two different intensities. *J Sci Med Sport*. 2005;8(4):441-5.
- ²¹⁴ 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.

- ²¹⁵ Davis PG, Bartoli WP, Durstine JL. Effects of acute exercise intensity on plasma lipids and apolipoproteins in trained runners. *J Appl Physiol*. 1992;72(3):914-9.
- ²¹⁶ Föger B, Wohlfarter T, Ritsch A, Lechleitner M, Miller CH, Dienstl A, Patsch JR. Kinetics of lipids, apolipoproteins, and cholesteryl ester transfer protein in plasma after a bicycle maratón. *Metabolism*. 1994;43(5):633-9.
- ²¹⁷ Eisenmann JC, Womack CJ, Reeves MJ, Pivarnik JM, Malina RM. Blood lipids in young distance runners. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(10):1661-6.
- ²¹⁸ Aellen R, Hollmann W, Boutellier U. Effects of aerobic and anaerobic training on plasma lipoproteins. *Int J Sports Med*. 1993;14(7):396-400.
- ²¹⁹ Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(Suppl 6):S438-45.
- ²²⁰ Rauramaa R, Väisänen SB, Rankinen T, Penttilä IM, Saarikoski S, Tuomilehto J, Nissinen A. Inverse relation of physical activity and apolipoprotein AI to blood pressure in elderly women. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(2):164-9.
- ²²¹ Seip RL, Moulin P, Cocke T, Tall A, Kohrt WM, Mankowitz K, Semenkovich CF, Ostlund R, Schonfeld G. Exercise training decreases plasma cholesteryl ester transfer protein. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(9):1359-67.
- ²²² Thomas NE, Baker JS, Davies B. Established and recently identified coronary heart disease risk factors in young people: the influence of physical activity and physical fitness. *Sports Med*. 2003;33(9):633-50.
- ²²³ Taimela S, Viikari JS, Porkka KV, Dahlen GH. Lipoprotein (a) levels in children and young adults: the influence of physical activity. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Acta Paediatr*. 1994;83(12):1258-63.
- ²²⁴ Mackinnon LT, Hubinger LM. Effects of exercise on lipoprotein(a). *Sports Med*. 1999;28(1):11-24.
- ²²⁵ Bermingham MA, Mahajan D, Neaverson MA. Blood lipids of cardiac patients after acute exercise on land and in water. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004;85(3):509-11.

- ²²⁶ Imamura H, Katagiri S, Uchid K, Miyamoto N, Nakano H, Shirota T. Acute effects of moderate exercise on serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins in sedentary young women. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000;27(12):975-9.
- ²²⁷ Lamon-Fava S, McNamara JR, Farber HW, Hill NS, Schaefer EJ. Acute changes in lipid, lipoprotein, apolipoprotein, and low-density lipoprotein particle size after an endurance triathlon. *Metabolism*. 1989;38(9):921-5.
- ²²⁸ Magkos F, Wright DC, Patterson BW, Mohammed BS, Mittendorfer B. Lipid metabolism response to a single, prolonged bout of endurance exercise in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(2):E355-62.
- ²²⁹ Ginsburg GS, Agil A, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. *JAMA*. 1996;276(3):221-5
- ²³⁰ Hubinger L, Mackinnon LT. The effect of endurance training on lipoprotein(a) [Lp(a)] levels in middle-aged males. *Med Sci Sports Exerc*. 1996;28(6):757-64.
- ²³¹ Lobo RA, Notelovitz M, Bernstein L, Khan FY, Ross RK, Paul WL. Lp(a) lipoprotein: relationship to cardiovascular disease risk factors, exercise, and estrogen. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;166(4):1182-8.
- ²³² Holme I, Urdal P, Anderssen S, Hjerermann I. Exercise-induced increase in lipoprotein (a). *Atherosclerosis*. 1996;122(1):97-104.
- ²³³ Ponjee GA, Janssen EM, van Wersch JW. Long-term physical exercise and lipoprotein(a) levels in a previously sedentary male and female population. *Ann Clin Biochem*. 1995;32(Pt 2):181-5.
- ²³⁴ Durstine JL, Ferguson MA, Szymanski LM, Davis PG, Alderson NL, Trost SG, Pate RR. Effect of a single session of exercise on lipoprotein(a). *Med Sci Sports Exerc*. 1996;28(10):1277-81.
- ²³⁵ Durstine JL, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, Trost SG. Effects of short-duration and long-duration exercise on lipoprotein(a). *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(9):1511-6.
- ²³⁶ Gruden G, Olivetti C, Taliano C, Furlani D, Gambino R, Pagano G, Cavallo-Perin P. Lipoprotein(a) after acute exercise in healthy subjects. *Int J Clin Lab Res*. 1996;26(2):140-1.

- ²³⁷ Holloszy JO, Skinner JS, Toro G, Cureton TK. Effects of a six month program of endurance exercise on the serum lipids of middle-aged man. *Am J Cardiol.* 1964;14:753-60.
- ²³⁸ Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, Lowe RC, Rohack JJ, Green JS. Effects of training and a single session of exercise on lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic men. *J Appl Physiol.* 1997;83(6):2019-28.
- ²³⁹ Crouse SF, O'Brien BC, Rohack JJ, Lowe RC, Green JS, Tolson H, Reed JL. Changes in serum lipids and apolipoproteins after exercise in men with high cholesterol: influence of intensity. *J Appl Physiol* (1985). 1995;79(1):279-86.
- ²⁴⁰ Sady SP, Thompson PD, Cullinane EM, Kantor MA, Domagala E, Herbert PN. Prolonged exercise augments plasma triglyceride clearance. *JAMA.* 1986;256(18):2552-5.
- ²⁴¹ Visich PS, Goss FL, Gordon PM, Robertson RJ, Warty V, Denys BG, Metz KF. Effects of exercise with varying energy expenditure on high-density lipoprotein-cholesterol. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1996;72(3):242-48.
- ²⁴² Thompson PD, Cullinane E, Henderson LO, Herbert PN. Acute effects of prolonged exercise on serum lipids. *Metabolism.* 1980;29(7):662-5.
- ²⁴³ Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(10):1563-9.
- ²⁴⁴ Plaisance EP, Grandjean PW. Physical activity and high-sensitivity C-reactive protein. *Sports Med.* 2006;36(5):443-58.
- ²⁴⁵ Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-54.
- ²⁴⁶ Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80:1055-81.
- ²⁴⁷ Dufaux B, Order U, Geyer H, Hollmann W. C-reactive protein serum concentrations in well-trained athletes. *Int J Sports Med.* 1984;5:102-6.
- ²⁴⁸ Verdaet D, Dendale P, De Bacquer D, Delanghe J, Block P, De Backer G. Association between leisure time physical activity and markers of inflammation related to coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2004;176:303-10.

- ²⁴⁹ King DE, Carek P, Mainous AG III, Pearson WS. Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35:575-81.
- ²⁵⁰ Rohde LEP, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol* 1999;84:1018-22.
- ²⁵¹ Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross section study. *BMJ.* 1996 27;312(7038):1061-5.
- ²⁵² Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, Miller GJ, Strachan DP. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis.* 2000;149(1):139-50.
- ²⁵³ Weight LM, Alexander D, Jacobs P. Strenuous exercise: analogous to the acute-phase response?. *Clin Sci (Lond).* 1991;81(5):677-83.
- ²⁵⁴ Siegel AJ, Stec JJ, Lipinska I, Van Cott EM, Lewandrowski KB, Ridker PM, Tofler GH. Effect of marathon running on inflammatory and hemostatic markers. *Am J Cardiol.* 2001;88(8):918-20.
- ²⁵⁵ Taylor C, Rogers G, Goodman C, Baynes RD, Bothwell TH, Bezwoda WR, Kramer F, Hattingh J. Hematologic, iron-related, and acute-phase protein responses to sustained strenuous exercise. *J Appl Physiol.* 1987;62(2):464-9.
- ²⁵⁶ Strachan AF, Noakes TD, Kotzenberg G, Nel AE, de Beer FC. C reactive protein concentrations during long distance running. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984;289(6454):1249-51.
- ²⁵⁷ Nosaka K, Clarkson PM. Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(8):953-61.
- ²⁵⁸ Noma A, Abe A, Maeda S, M Seishima, Makino K, Yano Y, Shimokawa K. Lp(a): an acute-phase reactant? *Chem Phys Lipids.* 1994;67-68:411-7.
- ²⁵⁹ Mbewu AD, Durrington PN, Bulleid S, Mackness MI. The immediate effect of streptokinase on serum lipoprotein (a) concentration and the effect of myocardial infarction on serum lipoprotein (a), apolipoprotein A1 and B, lipids and C-reactive protein. *Atherosclerosis.* 1993;103(1):65-71.
- ²⁶⁰ Oshima S, Uchida K, Yasu T, Uno K, Nonogi H, Haze K. Transient increase of plasma lipoprotein(a) in patients with unstable angina pectoris. Does lipoprotein(a) alter fibrinolysis? *Arterioscler Thromb.* 1991;11(6):1772-7.

- ²⁶¹ Randeve HS, Lewandowski KC, Drzewoski J, Brooke-Wavell K, O'Callaghan C, Czupryniak L, Hillhouse EW, Prelevic GM. Exercise decreases plasma total homocysteine in overweight young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(10):4496-501.
- ²⁶² Bailey D, Davies B, Baker J. Training in hipoxia: modulation of metabolic and cardiovascular risk factors in men. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(6):1058-66.
- ²⁶³ König D, Bissé E, Deibert P, Müller H-M, Wieland H, Berg A. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B₁₂. *Ann Nutr Metab.* 2003;47(3-4):114-8.
- ²⁶⁴ Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zeimbekis A, Zampelas A, Papademetriou L, Masoura C, Stefanadis C. The associations between smoking, physical activity, dietary habits and plasma homocysteine levels in cardiovascular disease-free people: the 'ATTICA' study. *Vasc Med.* 2004;9(2):117-23.
- ²⁶⁵ Unt E, Zilmer K, Mägi A, Kullisaar T, Kairane C, Zilmer M. Homocysteine status in former top-level male athletes: possible effect of physical activity and physical fitness. *Scand J Med Sci Sports.* 2008;18(3):360-6.
- ²⁶⁶ Nascimento CM, Stella F, Garlipp CR, Santos RF, Gobbi S, Gobbi LT. Serum homocysteine and physical exercise in patients with Parkinson's disease. *Psychogeriatrics.* 2011;11(2):105-12.
- ²⁶⁷ Loprinzi PD, Cardinal BJ. Interrelationships among physical activity, depression, homocysteine, and metabolic syndrome with special considerations by sex. *Prev Med.* 2012;54(6):388-92.
- ²⁶⁸ Boreham CA, Kennedy RA, Murphy MH, Tully M, Wallace WF, Young I. Training effects of short bouts of stair climbing on cardiorespiratory fitness, blood lipids, and homocysteine in sedentary young women. *Br J Sports Med.* 2005;39(9):590-3.
- ²⁶⁹ Guzel NA, Pinar L, Colakoglu F, Karacan S, Ozer C. Long-term callisthenic exercise-related changes in blood lipids, homocysteine, nitric oxide levels and body composition in middle-aged healthy sedentary women. *Chin J Physiol.* 2012;55(3):202-9.
- ²⁷⁰ Molina-López J, Molina JM, Chiroso LJ, Florea DI, Sáez L, Planells E. Effect of folic acid supplementation on homocysteine concentration and association with training in handball players. *J Int Soc Sports Nutr.* 2013;10(1):10.

- ²⁷¹ Vincent KR, Braith RW, Bottiglieri T, Vincent HK, Lowenthal DT. Homocysteine and lipoprotein levels following resistance training in older adults. *Prev Cardiol.* 2003;6(4):197-203.
- ²⁷² Vincent HK, Bourguignon C, Vincent KR. Resistance training lowers exercise-induced oxidative stress and homocysteine levels in overweight and obese older adults. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(11):1921-30.
- ²⁷³ Refsum H, Nurk E, Smith D, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygard O, Vollset SE. The Hordaland homocysteine study: A community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr.* 2006;136(Suppl 6):1731S-1740S.
- ²⁷⁴ Wright M, Francis K, Cornwell P. Effect of acute exercise on plasma homocysteine. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998;38(3):262-5.
- ²⁷⁵ De Créé C, Malinow MR, van Kranenburg GP, Geurten PG, Longford NT, Keizer HA. Influence of exercise and menstrual cycle phase on plasma homocyst(e)ine levels in young women-a prospective study. *Scand J Med Sci Sports.* 1999;9(5):272-8.
- ²⁷⁶ Herrmann M, Wilkinson J, Schorr H, Obeid R, Georg T, Urhausen A, Scharhag J, Kindermann W, Herrmann W. Comparison of the influence of volume-oriented training and high- intensity interval training on serum homocysteine and its cofactors in young, healthy swimmers. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(11):1525-31.
- ²⁷⁷ Herrmann M, Schorr H, Obeid R, Scharhag J, Urhausen A, Kindermann W, Herrmann W. Homocysteine increases during endurance exercise. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(11):1518-24.
- ²⁷⁸ Gelecek N, Teoman N, Ozdirenc M, Pinar L, Akan P, Bediz C, Kozan O. Influences of acute and chronic aerobic exercise on the plasma homocysteine level. *Ann Nutr Metab.* 2007;51(1):53-8.
- ²⁷⁹ De Créé C, Whiting PH, Cole H. Interactions between homocyst(e)ine and nitric oxide during acute submaximal exercise in adult males. *Int J Sports Med.* 2000;21(4):256-62.
- ²⁸⁰ Zinellu A, Sotgia S, Caria MA, Tangianu F, Casu G, Deiana L, Carru C. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. *Scand J Med Sci Sports.* 2007;17(4):452-6.
- ²⁸¹ Sotgia S, Carru C, Caria MA, Tadolini B, Deiana L, Zinellu A. Acute variations in homocysteine levels are related to creatine changes induced by physical activity. *Clin Nutr.* 2007;26(4):444-9.

- ²⁸² Gaume V, Mougin F, Figard H, Simon-Rigaud ML, N'Guyen UN, Callier J, Kantelip JP, Berthelot A. Physical training decreases total plasma homocysteine and cysteine in middle-aged subjects. *Ann Nutr Metab.* 2005;49(2):125-31.
- ²⁸³ Iglesias-Gutiérrez E, Egan B, Díaz-Martínez ÁE, Peñalvo JL, González-Medina A, Martínez-Cambor P, O'Gorman DJ, Úbeda N. Transient increase in homocysteine but not hyperhomocysteinemia during acute exercise at different intensities in sedentary individuals. *PLoS One.* 2012;7(12):e51185.
- ²⁸⁴ Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol (1985).* 1993;75(3):1354-63.
- ²⁸⁵ Fernández JM, Fuentes-Jiménez F, López-Miranda J. Función endotelial y ejercicio físico. *Rev Andal Med Deporte.* 2009;2(2):61-9.
- ²⁸⁶ Green DJ, Fowler DT, O'Driscoll JG, Blanksby BA, Taylor RR. Endothelium derived nitric oxide activity in forearm vessels of tennis players. *J Appl Physiol.* 1996;81(2):943-8.
- ²⁸⁷ Rywik TM, Blackman MR, Yataco AR, Vaitkevicius PV, Zink RC, Cottrell EH, Wright JG, Katzell LI, Fleg JL.. Enhanced endothelial vasoreactivity in endurance-trained older men. *J Appl Physiol.* 1999;87(6):2136-42.
- ²⁸⁸ 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.* 2000;101(25):2896-901.
- ²⁸⁹ Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation.* 2001;103(1):E1-6.
- ²⁹⁰ Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M, Colombo PC, Cohen-Solal A, Evans T, LeJemtel TH. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(1):194-8.
- ²⁹¹ Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res.* 1983;53(4):502-14.

- ²⁹² Teplan V, Mahrova A, Pitřha J, Racek J, Gürlich R, Teplan Jr V, Valkovsky I, Stollova M. Early Exercise Training After Renal Transplantation and Asymmetric Dimethylarginine: The Effect of Obesity. *Kidney Blood Press Res.* 2014;39(4):289-298.
- ²⁹³ Tanahashi K, Akazawa N, Miyaki A, Choi Y, Ra SG, Matsubara T, Kumagai H, Oikawa S, Miyauchi T, Maeda S Plasma ADMA concentrations associate with aerobic fitness in postmenopausal women. *Life Sci.* 2014;108(1):30-3.
- ²⁹⁴ Tanahashi K, Akazawa N, Miyaki A, Choi Y, Ra SG, Matsubara T, Kumagai H, Oikawa S, Maeda S. Aerobic exercise training decreases plasma asymmetric dimethylarginine concentrations with increase in arterial compliance in postmenopausal women. *Am J Hypertens.* 2014;27(3):415-21.
- ²⁹⁵ Maeda S, Miyaki A, Kumagai H, Eto M, So R, Tanaka K, Ajisaka R. Lifestyle modification decreases arterial stiffness and plasma asymmetric dimethylarginine level in overweight and obese men. *Coron Artery Dis.* 2013;24(7):583-8.
- ²⁹⁶ Thomson RL, Brinkworth GD, Noakes M, Clifton PM, Norman RJ, Buckley JD. The effect of diet and exercise on markers of endothelial function in overweight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012;27(7):2169-76.
- ²⁹⁷ Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, Seidinger D, Hammer A, Gröger M, Fialka-Moser V, Gschwandtner M, Koppensteiner R, Steiner S. Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis.* 2011;217(1):240-8.
- ²⁹⁸ Richter B, Niessner A, Penka M, Grdić 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.* 2005;94(6):1306-11.
- ²⁹⁹ Mittermayer F, Pleiner J, Krzyzanowska K, Wiesinger GF, Francesconi M, Wolzt M. Regular physical exercise normalizes elevated asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr.* 2005;117(23-24):816-20.
- ³⁰⁰ García-Rovés PM, Terrados N, Fernández SF, Patterson AM. Comparison of dietary intake and eating behavior of professional road cyclists during training and competition. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2000;10(1):82-98.

- ³⁰¹ Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*. 1999;45(2):290-2.
- ³⁰² Venta R, Fernández A, Gacimartín MV, Cándenas M. Validation of a method for rapid measurement of reduced forms of aminothiols in plasma based on SBDF derivatization. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(Suppl):S312.
- ³⁰³ Heresztyn, T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and N^G, N^G - and N^G, N^G'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;805(2):325-9.
- ³⁰⁴ Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, Funatsu T. High-performance liquid chromatographic assay of N(G)-monomethyl-L-arginine, N(G),N(G)-dimethyl-L-arginine, and N(G),N(G)'-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent. *J Chromatogr A*. 2005;1066(1-2):41-5.
- ³⁰⁵ Valtonen P, Karppi J, Nyssönen K, Valkonen VP, Halonen T, Punnonen K. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;828(1-2):97-102.
- ³⁰⁶ Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis*. 4^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2006.
- ³⁰⁷ Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumen of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*. 1974;37(2):247-8.
- ³⁰⁸ Kargotich S, Goodman C, Keast D, Morton AR. The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med*. 1998;26(2):101-17.
- ³⁰⁹ Kargotich S, Goodman C, Keast D, Fry RW, Garcia-Webb P, Crawford PM, Morton AR. Influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical data following high-intensity exercise. *Clin J Sport Med*. 1997;7(3):185-91.
- ³¹⁰ Luetkemeier MJ, Coles MG, Askew EW. Dietary sodium and plasma volume levels with exercise. *Sports Med*. 1997;23(5):279-86.
- ³¹¹ Kay B, O'Brien BJ, Gill ND. Exercise-Induced Hypervolemia may not be Consequential to Dehydration During Exercise. *J Sports Sci Med*. 2004;3(YISI 1):50-5.

- ³¹² Greenleaf JE, Convertino VA, Stremel RW, Bernauer EM, Adams WC, Vignau SR, Brock PJ. Plasma [Na⁺], [Ca²⁺], and volume shifts and thermoregulation during exercise in man. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1977;43(6):1026-32.
- ³¹³ Van Beaumont W, Greenleaf JE, Juhos L. Disproportional changes in hematocrit, plasma volume, and proteins during exercise and bed rest. *J Appl Physiol.* 1972;33(1):55-61.
- ³¹⁴ Dill DB, Horvath SM, Van Beaumont W, Gehlsen G, Burrus K. Sweat electrolytes in desert walks. *J Appl Physiol.* 1967;23(5):746-51.
- ³¹⁵ Senay LC Jr. Movement of water, protein and crystalloids between vascular and extra-vascular compartments in heat-exposed men during dehydration and following limited relief of dehydration. *J Physiol.* 1970;210(3):617-35.
- ³¹⁶ Poortmans JR. Serum protein determination during short exhaustive physical activity. *J Appl Physiol.* 1971;30(2):190-2.
- ³¹⁷ Senay LC Jr, Pivarnik JM. Fluid shifts during exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 1985;13:335-87.
- ³¹⁸ Boulay MR, Song TM, Serresse O, Thériault G, Simoneau JA, Bouchard C. Changes in plasma electrolytes and muscle substrates during short-term maximal exercise in humans. *Can J Appl Physiol.* 1995;20(1):89-101.
- ³¹⁹ Gillen CM, Lee R, Mack GW, Tomaselli CM, Nishiyasu T, Nadel ER. Plasma volume expansion in humans after a single intense exercise protocol. *J Appl Physiol.* 1991;71:1914-20.
- ³²⁰ Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Leppik JA, Sostaric S, McKenna MJ. N-Acetylcysteine infusion alters blood redox status but not time to fatigue during intense exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2003;94(4):1572-82.
- ³²¹ Goodman C, Rogers GG, Vermaak H, Goodman MR. Biochemical responses during recovery from maximal and submaximal swimming exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1985;54(4):436-41.
- ³²² McMurray RG. Plasma volume changes during submaximal swimming. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1983;51(3):347-56.
- ³²³ Fry RW, Morton AR, Garcia-Webb P, Keast D. Monitoring exercise stress by changes in metabolic and hormonal responses over a 24-h period. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991;63(3-4):228-34.

- ³²⁴ van Beaumont W, Underkofler S, van Beaumont S. Erythrocyte volume, plasma volume, and acid-base changes in exercise and heat dehydration. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1981;50(6):1255-62.
- ³²⁵ Holtzhausen LM, Noakes TD. The prevalence and significance of post-exercise (postural) hypotension in ultramarathon runners. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27(12):1592-601.
- ³²⁶ Fellmann N, Bedu M, Giry J, Pharmakis-Amadiou M, Bezou MJ, Barlet JP, Coudert J. Hormonal, fluid, and electrolyte changes during a 72-h recovery from a 24-h endurance run. *Int J Sports Med.* 1989;10(6):406-12.
- ³²⁷ Ploutz-Snyder LL1, Convertino VA, Dudley GA. Resistance exercise-induced fluid shifts: change in active muscle size and plasma volume. *Am J Physiol.* 1995;269(3 Pt 2):R536-43.
- ³²⁸ Jürimäe J, Jürimäe T, Pihl E. Changes in body fluids during endurance rowing training. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;904:353-8.
- ³²⁹ El-Sayed MS, Ali N, Omar AA. Effects of posture and ergometer-specific exercise modality on plasma viscosity and plasma fibrinogen: the role of plasma volume changes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;47(3):219-28.
- ³³⁰ Fellmann N. Hormonal and plasma volume alterations following endurance exercise. A brief review. *Sports Med.* 1992;13(1):37-49.
- ³³¹ Kjellberg SR, Ruhhe U, Sjöstrand T. Increase in the amount of hemoglobin and blood volume in connection with physical training. *Acta Physiol Scand.* 1949;19:146-51.
- ³³² Convertino VA. Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(12):1338-48.
- ³³³ Hill DW, Hill JS, Grisham SC, Zauner CW. Plasma volume response to exercise on five consecutive days. *J Sports Med Phys Fitness.* 1987;27(1):6-10.
- ³³⁴ Viru A, Karelson K, Smirnova T, Ereline J. Variability in blood glucose change during a 2-hour exercise. *Sports Medicine, Training and Rehabilitation.* 1995;6(2):127-37.
- ³³⁵ Newsholme EA. The control of fuel utilization by muscle during exercise and starvation. *Diabetes.* 1979;28 Suppl 1:1-7.

- ³³⁶ Liu ML, Bergholm R, Mäkimattila S, Lahdenperä S, Valkonen M, Hilden H, Yki-Järvinen H, Taskinen MR. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 1):E1083-91.
- ³³⁷ Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(9):5119-23.
- ³³⁸ Janssen GM, Degenaar CP, Menheere PP, Habets HM, Geurten P. Plasma urea, creatinine, uric acid, albumin, and total protein concentrations before and after 15-, 25-, and 42-km contests. *Int J Sports Med.* 1989;10 Suppl 3:S132-8.
- ³³⁹ Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1987 22;924(3):408-19.
- ³⁴⁰ Sjödín B, Hellsten Westing Y. Changes in plasma concentration of hypoxanthine and uric acid in man with short-distance running at various intensities. *Int J Sports Med.* 1990 Dec;11(6):493-5.
- ³⁴¹ Hellsten-Westling Y, Sollevi A, Sjödín B. Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1991;62(5):380-4.
- ³⁴² Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med.* 1999;33(4):264-9.
- ³⁴³ Green HJ, Fraser, IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc.* 1988;20(1):55-9.
- ³⁴⁴ Gastmann U, Dimeo F, Huonker M, Böcker J, Steinacker JM, Petersen KG, Wieland H, Keul J, Lehmann M. Ultra-triathlon-related blood-chemical and endocrinological responses in nine athletes. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998;38(1):18-23.
- ³⁴⁵ Whiting PH, Maughan RJ, Miller JD. Dehydration and serum biochemical changes in marathon runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1984;52(2):183-7.
- ³⁴⁶ Warburton DE, Welsh RC, Haykowsky MJ, Taylor DA, Humen DP. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise. *Br J Sports Med.* 2002;36(4):301-3.

- ³⁴⁷ Yang RC, Mack GW, Wolfe RR, Nadel ER. Albumin synthesis after intense intermittent exercise in human subjects. *J Appl Physiol.* 1998;84:584-92.
- ³⁴⁸ Haskell A, Nadel ER, Stachenfeld NS, Nagashima K, Mack GW. Transcapillary escape rate of albumin in humans during exercise-induced hypervolemia. *J Appl Physiol.* 1997;83:407-13.
- ³⁴⁹ Lang RE, Unger T, Ganten D. Atrial natriuretic peptide: a new factor in blood pressure control. *J Hypertens.* 1987;5(3):255-71.
- ³⁵⁰ Nagashima K, Mack GW, Haskell A, Nishiyasu T, and Nadel ER. Mechanism for the posturespecific plasma volume increase after a single intense exercise protocol. *J Appl Physiol.* 1999;86:867-73.
- ³⁵¹ Burke L. *Nutrición en el deporte: un enfoque práctico.* Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
- ³⁵² Williams PT. Relationship of distance run per week to coronary heart disease risk factors in 8283 male runners. The National Runners' Health Study. *Arch Intern Med.* 1997;157(2):191-8.
- ³⁵³ Williams PT. Relationships of heart disease risk factors to exercise quantity and intensity. *Arch Intern Med.* 1998;158(3):237-45.
- ³⁵⁴ Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(Suppl 6):S502-15.
- ³⁵⁵ Sgouraki E, Tsopanakis A, Kioussis A, Tsopanakis C. Acute effects of short duration endurance exercise on lipid, phospholipid and lipoprotein levels. *J Sports Med Phys Fitness.* 2004;44:444-50.
- ³⁵⁶ Kantor MA, Cullinane EM, Herbert PN, Thompson PD. Acute increase in lipoprotein lipase following prolonged exercise. *Metabolism.* 1984;33(5):454-7.
- ³⁵⁷ Gordon PM, Goss FL, Visich PS, Warty V, Denys BJ, Metz KF, Robertson RJ. The acute effects of exercise intensity on HDL-C metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 1994;26(6):671-7.
- ³⁵⁸ Kodama S, Tanaka S, Saito K, Shu M, Sone Y, Onitake F, Suzuki E, Shimano H, Yamamoto S, Kondo K, Ohashi Y, Yamada N, Sone H. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol. A meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007;167(10):999-1008.
- ³⁵⁹ Herbert PN, Bernier DN, Cullinane EM, Edelstein L, Kantor MA, Thompson PD. High-density lipoprotein metabolism in runners and sedentary men. *JAMA.* 1984;252(8):1034-7.

- ³⁶⁰ Dufaux B, Order U, Muller R, Hollmann W. Delayed effects of prolonged exercise on serum lipoproteins. *Metabolism*. 1986;35(2):105-9.
- ³⁶¹ Haskell WL. The influence of exercise on the concentrations of triglyceride and cholesterol in human plasma. *Exerc Sport Sci Rev*. 1984;12:205-44.
- ³⁶² Kiens B, Jörgensen I, Lewis S, Jensen G, Lithell H, Vessby B, Hoe S, Schnohr P. Increased plasma HDL-cholesterol and apo A-1 in sedentary middle-aged men after physical conditioning. *Eur J Clin Invest*. 1980;10(3):203-9.
- ³⁶³ Wållberg-Jonsson S, Uddhammar A, Dahlén G, Rantapää-Dahlqvist S. Lipoprotein(a) in relation to acute phase reaction in patients with rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Scand J Clin Lab Invest*. 1995;55(4):309-15.
- ³⁶⁴ Mooser V, Berger MM, Tappy L, Cayeux C, Marcovina SM, Darioli R, Nicod P, Chioléro R. Major reduction in plasma Lp(a) levels during sepsis and burns. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(4):1137-42.
- ³⁶⁵ Lippi G, Schena F, Salvagno GL, Montagnana M, Ballestrieri F, Guidi GC. Comparison of the lipid profile and lipoprotein(a) between sedentary and highly trained subjects. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(3):322-6.
- ³⁶⁶ Hubinger L, Mackinnon LT, Lepre F. Lipoprotein(a) [Lp(a)] levels in middle-aged male runners and sedentary controls. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(4):490-6.
- ³⁶⁷ Hellsten G, Boman K, Hallmans G, Dahlén G. Lipids and endurance physical activity. *Atherosclerosis*. 1989;75(1):93-4.
- ³⁶⁸ Kronenberg F, Steinmetz A, Kostner GM, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1996;33(6):495-543.
- ³⁶⁹ Wirth A, Diehm C, Kohlmeier M, Heuck CC, Vogel I. Effect of prolonged exercise on serum lipids and lipoproteins. *Metabolism*. 1983;32(7):669-72.
- ³⁷⁰ Frey I, Baumstark MW, Berg A, Keul J. Influence of acute maximal exercise on lecithin:cholesterol acyltransferase activity in healthy adults of differing aerobic performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1991;62(1):31-5.

- ³⁷¹ Ostrowski K, Hermann C, Bangash A, Schjerling P, Nielsen JN, Pedersen BK. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol.* 1998;513(Pt 3):889-94.
- ³⁷² Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 1999;515(Pt 1):287-91.
- ³⁷³ Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002;16(11):1335-47.
- ³⁷⁴ Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2001;84(3):244-5.
- ³⁷⁵ Jordan J, Beneke R, Hutler M, Veith A, Haller H, Luft FC. Moderate exercise leads to decreased expression of beta1 and beta2 integrins on leucocytes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1997;76(2):192-4.
- ³⁷⁶ Liesen H, Dufaux B, Hollmann W. Modifications of serum glycoproteins the days following a prolonged physical exercise and the influence of physical training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1977;37(4):243-54.
- ³⁷⁷ Kondo N, Nomura M, Nakaya Y, Ito S, Ohguro T. Association of inflammatory marker and highly sensitive C-reactive protein with aerobic exercise capacity, maximum oxygen uptake and insulin resistance in healthy middle-aged volunteers. *Circ J.* 2005;69(4):452-7.
- ³⁷⁸ Nunes RA, Araújo F, Correia GF, da Silva GT, Mansur AJ. High-sensitivity C-reactive protein levels and treadmill exercise test responses in men and women without overt heart disease. *Exp Clin Cardiol.* 2013;18(2):124-8.
- ³⁷⁹ van Leeuwen HJ, Heezius EC, Dallinga GM, van Strijp JA, Verhoef J, van Kessel KP. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(5):1359-66.
- ³⁸⁰ Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* 2004;21(3):210-21.
- ³⁸¹ Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem.* 1993;39(9):1764-79.

- ³⁸² Nygård O, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(2):263-70.
- ³⁸³ de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample. *Am J Epidemiol.* 2001;154(2):150-4.
- ³⁸⁴ Sjöberg B, Anderstam B, Suliman M, Alvestrand A. Plasma reduced homocysteine and other aminothiols concentrations in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(1):60-71.
- ³⁸⁵ Ventura P, Panini R, Pasini MC, Scarpetta G, Salvioli G. N -Acetyl-cysteine reduces homocysteine plasma levels after single intravenous administration by increasing thiols urinary excretion. *Pharmacol Res.* 1999;40(4):345-50.
- ³⁸⁶ Andersson A, Lindgren A, Arnadottir M, Prytz H, Hultberg B. Thiols as a measure of plasma redox status in healthy subjects and in patients with renal or liver failure. *Clin Chem.* 1999;45(7):1084-6.
- ³⁸⁷ Williams RH, Maggiore JA, Reynolds RD, Helgason CM. Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clin Chem.* 2001;47(6):1031-9.
- ³⁸⁸ Campolo J, Caruso R, De Maria R, Parolini M, Oliva F, Roubina E, Cighetti G, Frigerio M, Vitali E, Parodi O. Aminothiol redox alterations in patients with chronic heart failure of ischaemic or non-ischaemic origin. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2007;8(12):1024-8.
- ³⁸⁹ Mansoor MA, Svoldal AM, Ueland PM. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine and glutathione in human plasma. *Anal Biochem.* 1992;200(2):218-29.
- ³⁹⁰ Husted LB, Sørensen ES, Sottrup-Jensen L. 4-(Aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole is not specific for labeling of sulfhydryl groups in proteins as it may also react with phenolic hydroxyl groups and amino groups. *Anal Biochem.* 2003;314(1):166-8.
- ³⁹¹ Santa T, Aoyama C, Fukushima T, Imai K, Funatsu T. Suppression of thiol exchange reaction in the determination of reduced-form thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorogenic benzofurazan reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate and 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(6-7):656-61.

- ³⁹² Real JT, Merchante A, Gómez JL, Chaves FJ, Ascaso JF, Carmena R. Effects of marathon running on plasma total homocysteine concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(2):134-9.
- ³⁹³ Hammouda OI, Chtourou H, Chaouachi A, Chahed H, Ferchichi S, Kallel C, Chamari K, Souissi N. Effect of short-term maximal exercise on biochemical markers of muscle damage, total antioxidant status, and homocysteine levels in football players. *Asian J Sports Med.* 2012;3(4):239-46.
- ³⁹⁴ Rennie MJ, Tipton KD. Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:457-83.
- ³⁹⁵ Van Hall G, Saltin B, Wagenmakers AJ. Muscle protein degradation and amino acid metabolism during prolonged kneeextensor exercise in humans. *Clin Sci (Lond).* 1999;97(5):557-67.
- ³⁹⁶ e Silva A de S, da Mota MP. Effects of physical activity and training programs on plasma homocysteine levels: a systematic review. *Amino Acids.* 2014;46(8):1795-804.
- ³⁹⁷ Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(5):E1095-100.
- ³⁹⁸ Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(3):227-32.
- ³⁹⁹ Hildebrandt W, Kinscherf R, Hauer K, Holm E, Droßge W. Plasma cystine concentration and redox state in aging and physical exercise. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(9):1269-81.
- ⁴⁰⁰ Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Russo R, Deferrari G, Rossi D, Verzola D, Gandolfo MT, Sala MR. Interorgan exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(4):E757-63.
- ⁴⁰¹ Hoffer LJ, Robitaille L, Elian KM, Bank I, Hongsprabhas P, Mamer OA. Plasma reduced homocysteine concentrations are increased in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2001;59(1):372-7.
- ⁴⁰² Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(4):F671-8.
- ⁴⁰³ Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(2):422-7.

- ⁴⁰⁴ Liao D, Tan H, Hui R, Li Z, Jiang X, Gaubatz J, Yang F, Durante W, Chan L, Schafer AI, Pownall HJ, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res.* 2006;99(6):598-606.
- ⁴⁰⁵ Mikael LG, Genest J Jr, Rozen R. Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. *Circ Res.* 2006;98(4):564-71.
- ⁴⁰⁶ Gaenger H, Neumayr G, Marschang P, Sturm W, Kirchmair R, Patsch JR. Flow-mediated vasodilation of the femoral and brachial artery induced by exercise in healthy nonsmoking and smoking men. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(5):1313-9.
- ⁴⁰⁷ Spence AL, Carter HH, Naylor LH, Green DJ. A prospective randomized longitudinal study involving 6 months of endurance or resistance exercise. Conduit artery adaptation in humans. *J Physiol.* 2013;591(Pt 5):1265-75.
- ⁴⁰⁸ Gonzales JU, Thompson BC, Thistlethwaite JR, Scheuermann BW. Association between exercise hemodynamics and changes in local vascular function following acute exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011;36(1):137-44.
- ⁴⁰⁹ Cosio-Lima LM, Thompson PD, Reynolds KL, Headley SA, Winter CR, Manos T, Lagasse MA, Todorovich JR, Germain M. The acute effect of aerobic exercise on brachial artery endothelial function in renal transplant recipients. *Prev Cardiol.* 2006;9(4):211-4.
- ⁴¹⁰ Tschakovsky ME, Pyke KE. Counterpoint: flow-mediated dilation does not reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol (1985).* 2005;99(3):1235-8.
- ⁴¹¹ Doshi SN, Naka KK, Payne N, Jones CJ, Ashton M, Lewis MJ, Goodfellow J. Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond).* 2001;101(6):629-35.
- ⁴¹² Pyke K, Green DJ, Weisbrod C, Best M, Dembo L, O'Driscoll G, Tschakovsky M. Nitric oxide is not obligatory for radial artery flow-mediated dilation following release of 5 or 10 min distal occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(1):H119-26.
- ⁴¹³ Thijssen DH, Black MA, Pyke KE, Padilla J, Atkinson G, Harris RA, Parker B, Widlansky ME, Tschakovsky ME, Green DJ. Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(1):H2-12.

- ⁴¹⁴ Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res.* 1999;41(3):765-72.
- ⁴¹⁵ Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;32(3):423-9.
- ⁴¹⁶ Allen JD, Miller EM, Schwark E, Robbins JL, Duscha BD, Annex BH. Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance. *Nitric Oxide.* 2009;20(4):231-7.
- ⁴¹⁷ Bode-Böger SM, Böger RH, Schröder EP, Frölich JC. Exercise increases systemic nitric oxide production in men. *J Cardiovasc Risk.* 1994;1(2):173-8.
- ⁴¹⁸ Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm A. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol (1985).* 1997;82(3):760-4.
- ⁴¹⁹ Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm A. Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br J Pharmacol.* 1995;114(8):1621-24.
- ⁴²⁰ Rhodes P, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S, Rhodes PM [corrected to Rhodes P]. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(2):590-6.
- ⁴²¹ Mochizuki S, Toyota E, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Takemoto M, Tanaka Y, Kawahara K, Kajiya F. Effect of dietary control on plasma nitrate level and estimation of basal systemic nitric oxide production rate in humans. *Heart Vessels.* 2000;15(6):274-9.
- ⁴²² Wang J, Brown MA, Tam SH, Chan MC, Whitworth JA. Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24(6):418-20.
- ⁴²³ Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem.* 1998;31(4):195-220.
- ⁴²⁴ Jobgen WS, Jobgen SC, Li H, Meininger CJ, Wu G. Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;851(1-2):71-82.
- ⁴²⁵ Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res.* 2005;39(8):797-815.

- ⁴²⁶ Sureda A, Tauler P, Aguiló A, Fuentespina E, Córdova A, Tur JA, Pons A. Blood cell NO síntesis in response to exercise. *Nitric Oxide*. 2006;15(1):5-12.
- ⁴²⁷ Rognmo O, Bjørnstad TH, Kahrs C, Tjønnhaug AE, Bye A, Haram PM, Stølen T, Slørdahl SA, Wisløff U. Endothelial function in highly endurance-trained men: effects of acute exercise. *J Strength Cond Res*. 2008;22(2):535-42.
- ⁴²⁸ Node K, Kitakaze M, Sato H, Koretsune Y, Katsube Y, Karita M, Kosaka H, Hori M. Effect of acute dynamic exercise on circulating plasma nitric oxide level and correlation to norepinephrine release in normal subjects. *Am J Cardiol*. 1997;79(4):526-8.
- ⁴²⁹ Güzel NA, Hazar S, Erbas D. Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *J Sports Sci Med*. 2007;6(4):417-22.
- ⁴³⁰ Poveda JJ, Riestra A, Salas E, Cagigas ML, López-Somoza C, Amado JA, Berrazueta JR. Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. *Eur J Clin Invest*. 1997;27(11):967-71.
- ⁴³¹ St Croix CM, Wetter TJ, Pegelow DF, Meyer KC, Dempsey JA. Assessment of nitric oxide formation during exercise. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(4 Pt 1):1125-33.
- ⁴³² Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *J Appl Physiol* (1985). 2005 Sep;99(3):1233-4.
- ⁴³³ Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*. 1986;8(1):37-44.
- ⁴³⁴ Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J*. 2000;14(12):1685-96.
- ⁴³⁵ Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ. Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1663-71.
- ⁴³⁶ Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*. 2005;568(Pt 2):357-69.
- ⁴³⁷ Bradley SJ, Kingwell BA, McConell GK. Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. *Diabetes*. 1999;48(9):1815-21.

- ⁴³⁸ Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1997;82(1):359-63.
- ⁴³⁹ Hayashi T, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 1):E1039-51.
- ⁴⁴⁰ Eriksson LS, Broberg S, Björkman O, Wahren J. Ammonia metabolism during exercise in man. *Clin Physiol.* 1985;5(4):325-36.
- ⁴⁴¹ Bergström J, Fürst P, Hultman E. Free aminoacids in muscle tissue and plasma during exercise in man. *Clin Physiol.* 1985;5(2):155-60.
- ⁴⁴² Shoemaker WC. *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva.* 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2002.
- ⁴⁴³ Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol.* 2003;206(Pt 12):2083-7.
- ⁴⁴⁴ Morris SM Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.* 2004;134(10 Suppl):2743S-2747S.
- ⁴⁴⁵ Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(5):275-85.
- ⁴⁴⁶ Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33(4):652-8.
- ⁴⁴⁷ Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishizaka H, Hanada H, Okumura K. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels.* 2003;18(4):177-82.
- ⁴⁴⁸ Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, Stefanadis C. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(8):667-76.

- ⁴⁴⁹ Böger RH, Diemert A, Schwedhelm E, Lüneburg N, Maas R, Hecher K. The role of nitric oxide synthase inhibition by asymmetric dimethylarginine in the pathophysiology of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;69(1):1-13.
- ⁴⁵⁰ Brinkmann SJ, de Boer MC, Buijs N, van Leeuwen PA. Asymmetric dimethylarginine and critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2014;17(1):90-7.
- ⁴⁵¹ Paroni R, Barassi A, Ciociola F, Dozio E, Finati E, Fermo I, Ghilardi F, Colpi GM, Corsi MM, Melzi d'Eril GV. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and L-arginine in patients with arteriogenic and non-arteriogenic erectile dysfunction. *Int J Androl.* 2012;35(5):660-7.
- ⁴⁵² Krzyzanowska K, Mittermayer F, Kopp HP, Wolzt M, Schernthaner G. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6277-81.
- ⁴⁵³ Blackwell S, O'Reilly DS, Talwar DK. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. *Clin Chim Acta.* 2009;401(1-2):14-9.
- ⁴⁵⁴ Meinitzer A, Puchinger M, Winklhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J, Roob JM, Sundl I, Halwachs-Baumann G, März W. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin Chim Acta.* 2007;384(1-2):141-8.
- ⁴⁵⁵ Zhang WZ, Kaye DM. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthalaldehyde precolumn derivatization. *Anal Biochem.* 2004;326(1):87-92.
- ⁴⁵⁶ Marra M, Bonfigli AR, Testa R, Testa I, Gambini A, Coppa G. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal Biochem.* 2003;318(1):13-7.
- ⁴⁵⁷ Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2002;303(2):131-7.

- ⁴⁵⁸ Tsunoda M, Nonaka S, Funatsu T. Determination of methylated arginines by column-switching high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Analyst*. 2005;130(10):1410-3.
- ⁴⁵⁹ Huang LF, Guo FQ, Liang YZ, Li BY, Cheng BM. Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2004;380(4):643-9.
- ⁴⁶⁰ Albsmeier J, Schwedhelm E, Schulze F, Kastner M, Böger RH. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;809(1):59-65.
- ⁴⁶¹ Krempl TK, Maas R, Sydow K, Meinertz T, Böger RH, Kähler J. Elevation of asymmetric dimethylarginine in patients with unstable angina and recurrent cardiovascular events. *Eur Heart J*. 2005;26(18):1846-51.
- ⁴⁶² Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Böger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(10):622-6.
- ⁴⁶³ Pettersson A, Ugglå L, Backman V. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;692(2):257-62.
- ⁴⁶⁴ Reinecke NL, Cunha TM, Heilberg IP, Higa EM, Nishiura JL, Neder JA, Almeida WS, Schor N. Exercise capacity in polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(2):239-46.
- ⁴⁶⁵ Riccioni G, Scotti L, Guagnano MT, Bosco G, Bucciarelli V, Di Ilio E, Speranza L, Martini F, Bucciarelli T. Physical exercise reduces synthesis of ADMA, SDMA, and L-Arg. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2015;7:417-22.
- ⁴⁶⁶ Hanssen H, Nickel T, Drexel V, Hertel G, Emslander I, Sisic Z, Lorang D, Schuster T, Kotliar KE, Pressler A, Schmidt-Trucksäss A, Weis M, Halle M. Exercise-induced alterations of retinal vessel diameters and cardiovascular risk reduction in obesity. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):433-9.
- ⁴⁶⁷ Forray MI, Angelo S, Boyd CA, Devés R. Transport of nitric oxide synthase inhibitors through cationic amino acid carriers in human erythrocytes. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(12):1963-8.

Anexo I. Publicaciones

Plasma Vitamins, Amino Acids, and Renal Function in Postexercise Hyperhomocysteinemia

RAFAEL VENTA^{1,2}, ELENA CRUZ¹, GRACIA VALCÁRCEL¹, and NICOLÁS TERRADOS^{3,4}

¹Service of Biochemistry, Hospital San Agustín, Avilés, Principado de Asturias, SPAIN; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Principado de Asturias, SPAIN, and ³Regional Centre of Sport Medicine, Fundación Deportiva Municipal, Avilés, Principado de Asturias, SPAIN; and ⁴Department of Functional Biology, University of Oviedo, Principado de Asturias, SPAIN

ABSTRACT

VENTA, R., E. CRUZ, G. VALCÁRCEL, and N. TERRADOS. Plasma Vitamins, Amino Acids, and Renal Function in Postexercise Hyperhomocysteinemia. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 41, No. 8, pp. 1645–1651, 2009. Several studies have assessed the effect of the physical activity on plasma homocysteine (Hcy) concentrations, although the findings have been contradictory, and the exact mechanism by which plasma Hcy concentrations varied after an acute intense exercise remains unknown. **Purpose:** We studied the effect of different acute aerobic intense exercises on plasma, reduced, and total Hcy (rHcy, tHcy) and cysteine (rCys, tCys) and on its metabolically related vitamins and amino acids. Parallel effects on renal function were assessed by plasma creatinine. **Methods:** Fifteen cyclists and 14 kayakers were examined before and 30 ± 5 min after a specific test to exhaustion during a low-intensity training period. **Results:** After a bout of specific exercise, the concentrations of aminothiols were increased regardless of the group considered. Plasma concentrations were higher than baseline values in tHcy ($17.7 \pm 1.5\%$; $P < 0.001$), rHcy ($10.6 \pm 1.6\%$; $P < 0.001$), tCys ($9.9 \pm 1.6\%$; $P < 0.001$), and rCys ($7.6 \pm 2.2\%$; $P < 0.01$). Both groups showed significant elevations of pyridoxal-5'-phosphate (PLP; $P < 0.01$), vitamin B₁₂ ($P < 0.001$), and creatinine concentrations ($P < 0.001$) after acute exercises, but no changes were seen in folate. Changes in plasma aminothiols after exercise did not reach significant correlation with changes in free amino acids or baseline vitamins, but significant and positive correlations were observed with changes in plasma PLP, vitamin B₁₂, and creatinine concentrations, when the pooled data were considered. **Conclusions:** Our results show that higher plasma concentrations of tHcy after an acute intense exercise are associated to higher concentrations of rHcy, and this effect is independent of the type of exercise, vitamin status, or amino acid metabolic stress but could be related to potential changes in the renal function. **Key Words:** HOMOCYSTEINE, EXERCISE, CREATININE, VITAMIN B₁₂, PLP, FOLATE, FREE PLASMA AMINO ACIDS

Homocysteine (Hcy) is a sulfur-containing amino acid derivative of methionine, which has been argued as a risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD) (6,35). Moderate elevations in plasma total homocysteine (tHcy) concentrations have been involved in atherosclerosis through different mechanisms (16,37): a prothrombotic effect due to the interaction with procoagulant factors, a direct cytotoxic effect on endothelial cells, or an *in vivo* endothelial dysfunction due to the promotion of inflammation or oxidative stress.

Regular physical activity is now well established as a key component in the maintenance of good health and disease prevention, and there has been specifically recognized to reduce the risk for the development of CVD (2). This effect is generally associated with more favorable novel and traditional cardiovascular biomarkers levels (19), but for plasma tHcy, the results are contradictory. There is a spectrum of studies directly investigating the effect of physical exercise on plasma tHcy. Lower plasma concentrations of tHcy have been observed in subjects practicing regular physical activity (23) and were inversely related to cardiorespiratory fitness ($\dot{V}O_{2\max}$) (31), although these observations have not been a constant finding. On the contrary, acute intense exercise has been demonstrated to increase plasma tHcy concentrations (15), in an extent somehow related with the type, duration, and intensity of exercise.

The exact mechanism by which plasma tHcy concentrations increase after an acute intense exercise is unknown. It has been shown that acute exercise increases oxygen uptake and free radical production (14), which in turn could influence thiol-disulfide exchange and thiol redox reactions

Address for correspondence: Dr. Rafael Venta Obaya, Service of Biochemistry, Hospital San Agustín, Camino de Heros 6, 33400 Avilés, Asturias; E-mail: rafael.venta@sespa.princast.es.

Submitted for publication October 2008.

Accepted for publication January 2009.

0195-9131/09/4108-1645/0

MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®

Copyright © 2009 by the American College of Sports Medicine

DOI: 10.1249/MSS.0b013e31819e02f2

leading to increased oxidized forms in plasma and, therefore, increased tHcy concentrations. Two additional mechanisms for the hyperhomocysteinemic effect of strenuous exercise may involve the nonenergetic exercise-induced metabolic stress. First, exercise may involve an increased demand of several methylated substrates, such as creatine or acetylcholine (10), giving rise to an accelerated consumption of the methyl donor *S*-adenosylmethionine, converted into *S*-adenosylhomocysteine, which is reversible hydrolyzed to Hcy and adenosine (28). Second, acute physical activity may cause muscular damage and accelerate protein catabolism, which will produce an increase of muscular amino acid pools and, in turn, of the Hcy production in the methionine metabolism (10,32). In both situations, the primary synthesis of Hcy occurs in the reduced form, and the excess of reduced Hcy (rHcy) for the capacity of remethylation and transsulfuration pathways undergoes export to the extracellular space and oxidation (3). As a result, it could be hypothesized that an increase in plasma rHcy could be detected along with the increase in plasma tHcy. On the contrary, a possible finding of increased tHcy concentrations after exercise without concomitant higher concentrations of rHcy would be related to substantial differences in the clearance rates of the oxidized and reduced forms from blood, as it has been previously referred (12).

Exercise has long been associated with an increased amino acid turnover and with several plasma changes in amino acid concentrations. Quantitatively, most important changes are due to increased muscular capture of plasma branched-chain amino acids for energetic metabolism and export to circulation of alanine (Ala) and glutamine for gluconeogenesis in liver cells, but minor effects on plasma concentrations of other amino acids have also been identified (32). Changes in plasma concentrations of Hcy and other amino thiols in exercise may also respond to this enhanced metabolic stress. On the other hand, the metabolism of sulfur amino acids requires the coenzyme function of vitamin B₁₂ and folate in the remethylation of Hcy to methionine (Met), as well as pyridoxal-5'-phosphate (PLP), the active form of vitamin B₆, in the transsulfuration pathway through cystathionine and cysteine (Cys). Likewise, PLP is a coenzyme for transaminases, decarboxylases, and other enzymes used in metabolic transformations of amino acids, and folate participates in some of these processes as part of the one-carbon pool. Thus, in acute exercise, altered vitamin availability may contribute to the hyperhomocysteinemia and to other plasma amino acid changes.

On the other hand, a potential relationship between the exercise-induced changes in plasma tHcy concentrations and renal function has not received as much attention as was to be expected of the interaction showed in the general population (23). Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of incremental bouts of two aerobic intense exercises, cycling and kayaking, which represent

very different muscular demands, on plasma reduced and total concentrations of Hcy and Cys (rCys, tCys) and on the metabolically related vitamins B₆ and B₁₂, folate, amino acids, and creatinine. Plasma changes were studied in young healthy athletes before and after a single bout of specific exercise during a less intense training period at the beginning of the season.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Twenty-nine healthy male aerobic athletes aged between 14 and 22 yr were included into the study: 15 cyclists younger than 23 yr from a nonprofessional cycling team, performing long-duration aerobic training and 14 kayakers from the Spanish Junior National Team, performing shorter and more intense aerobic training and resistance-strength training. Men were selected as subjects because of the stability of their hormonal status.

The study was performed in accordance with the Helsinki Declaration of the World Medical Association, and informed consent was requested from parents and subjects. Each participant gave written, informed consent, and the study protocol was approved by the external Regional Ethical Committee of Clinical Investigation of the Principado de Asturias. At recruitment, all participants underwent a medical examination.

Experimental Procedure

Participants were studied during a period of low-intensity training and were advised to avoid changes in dietetic or lifestyle habits the week before the experiment. Cyclists and kayakers underwent a bout of incremental specific exercise test to exhaustion, described elsewhere, lasting approximately 28 min in cyclists and 21 min in kayakers (7,20). Tests were carried out in a cycle ergometer (Orion S.T.E., Toulouse, France) and a kayak ergometer (Modest, Odense, Denmark). Expired respiratory gases, $\dot{V}O_{2max}$, and RER were determined by a metabolic cart (V_{max} 29; Sensor-Medics, Corp, Yorba Linda, CA). HR was continuously monitored by telemetry (Polar, Kempele, Finland), and the capillary blood lactate concentration was analyzed by an electroenzymatic method (Analox GM7, London, England).

Blood Sampling and Processing

After an overnight fast, immediately before and 30 ± 5 min after the exercise test, venous blood samples were collected from antecubital vein in four evacuated tubes for each subject: a) plain tubes for analysis of folate and vitamin B₁₂ and basic metabolites including creatinine (Vacuette; Greiner Bio-one, Kremansmünster, Austria); b) heparinized tubes for amino acids (Vacuette); c) EDTA-containing tubes for hemoglobin, hematocrit, and vitamin B₆ (Vacuette); and d) acidified sodium citrate (pH 4.3)-containing tubes for

analysis of reduced and total Hcy and Cys (Stabilyte; Biopool, Umeå, Sweden).

For heparinized and acidified citrate plasma samples, tubes were immediately transported to the laboratory in a refrigerated container and then centrifuged at 3000g for 5 min at 4°C. Blood without anticoagulant was allowed to clot for 10 min at room temperature and centrifuged at 2000g for 10 min at 4°C. Plasma and serum samples were aliquoted and stored at -80°C until analysis.

Whole-blood EDTA tubes were directly introduced in a Sysmex XE2100 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to measure hemoglobin and hematocrit. Both data were used to account for plasma volume change after exercise, according to the formula from Dill and Costill (5). Before statistical analysis, the concentrations of plasma amino thiols, vitamins, amino acids, and creatinine were adjusted for plasma volume change after exercise.

For every metabolite, pre- and postexercise samples were analyzed in the same batch.

Biochemical Analyses

Hcy and Cys. Acidified sodium citrate plasma samples were analyzed within 2 wk after storage at -80°C, a period that allows a satisfactory recovery of the reduced forms of amino thiols (38). Total concentrations were analyzed as described by Pfeiffer et al. (21), and reduced plasma concentrations were assessed using a derived method previously validated in our laboratory (33), with minor modifications.

In short, total thiols were determined in the plasma after reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine and protein precipitation with trichloroacetic acid (TCA). The clear TCA supernatants were incubated for 60 min at 60°C with 4-fluoro-7-sulfobenzofurazan (SBD-F) in sodium borate buffer, pH 10. For reduced thiols analysis, plasma was directly incubated with SBD-F in borate buffer at 60°C for 60 min and further precipitated with TCA. Thiol separations were performed by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC; Breeze Waters, Milford, MA) according to the method of Pfeiffer.

Quantitative analysis was performed with the use of a common Hcy/Cys external standard in both procedures, as well as an internal standard, cysteamine, in the total concentrations determination. The within-day and between-day coefficients of variation were below 2.8% and 4.1% and below 4.1% and 12.1% for total and reduced concentrations, respectively.

Amino acids, vitamins, and creatinine. Measurements of amino acid concentrations in heparinized plasma samples were performed by gradient RP-HPLC using the Pico Tag method (Waters) according to the manufacturer's specifications. Methionine sulphone was used as internal standard as well as a calibration mixture of two commercial solutions (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) of acid-neutral and basic amino acids in HCl 0.1

mol·L⁻¹. The within-day and between-day coefficients of variation ranged between 5.4% and 9.9%.

The assay for plasma vitamin B₆, as PLP, on the basis of precolumn derivatization and fluorometric detection, was performed by isocratic RP-HPLC as described by Talwar et al. (30). A commercially certified calibrator (Chromsystems, Martinsried, Germany) was used. The within-day and between-day coefficients of variation were 2.3% and 5.3%, respectively, at the concentration of 55.9 nmol·L⁻¹.

Serum concentrations of creatinine and vitamin B₁₂ and folate were determined with a Jaffe kinetic method and electrochemiluminescence immunoassays, respectively, in an SWA Modular Analytics from Roche Diagnostics.

Statistical Analysis

Data are given as mean ± SEM or median and percentiles (*P*₉₀), according to their distribution. Gaussian distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test and by the verification of the straightness of a normal plot. Log transformations were needed for PLP and folate in the comparison tests. Main effects were analyzed by two-way ANOVA (exercise × group) for repeated measures with exercise as the repeated measure. The relation between variables was evaluated by Pearson correlation coefficient or Spearman rank-order correlation coefficient, as appropriate. Two-tailed *P* < 0.05 values were considered statistically significant. The statistical analysis was carried out with the SPSS software (11.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Anthropometric, biochemical, and hematological characteristics of subjects before exercise tests are shown in Table 1. Significant differences between kayakers and cyclists were observed in the anthropometric data, in the extension of training period (50% longer in cyclists), and in baseline level of fitness (20% higher $\dot{V}O_{2max}$ in cyclists). However, the most common biochemical and hematological analytes were similar in both groups, with the exception of a significantly higher hemoglobin concentration in cyclists.

TABLE 1. Anthropometrical and hematological data at baseline.

	Kayakers	Cyclists
Age (yr)	17 ± 1	21 ± 1***
Body weight (kg)	76.3 ± 1.1	67.4 ± 1.5***
Height (cm)	178.4 ± 1.6	177.7 ± 1.2
BMI (kg·m ⁻²)	23.9 ± 0.3	21.3 ± 0.4***
Body fat (%)	11.2 ± 0.4	9.6 ± 0.2**
SM4 (mm)	35.3 ± 2.9	24.8 ± 1.1**
$\dot{V}O_{2max}$ (mL·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	59.0 ± 1.8	71.4 ± 1.3***
Training period (yr)	5.5 ± 0.1	11.7 ± 0.3***
Hemoglobin (mmol·L ⁻¹)	9.07 ± 0.13	9.56 ± 0.12**
Hematocrit (%)	44.3 ± 0.7	44.2 ± 0.6

Values are means ± SEM. Differences between groups:

***P* < 0.01.

****P* < 0.001.

BMI, body mass index; SM4, sum of four skinfolds; $\dot{V}O_{2max}$, maximal oxygen consumption.

TABLE 2. Plasma or serum concentrations of aminothiols, vitamins, creatinine, and ratios ($\times 100$) before and after exercise.

	Kayakers		Cyclists	
	Before	After	Before	After
rHcy ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	0.182 \pm 0.013	0.197 \pm 0.013	0.149 \pm 0.006	0.167 \pm 0.006
tHcy ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	6.97 \pm 0.44	8.16 \pm 0.48	6.68 \pm 0.27	7.87 \pm 0.33
rCys ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	4.79 \pm 0.26	4.93 \pm 0.21	4.76 \pm 0.13	5.26 \pm 0.20
tCys ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	176.4 \pm 3.4	188.5 \pm 5.1	187.6 \pm 3.9	211.2 \pm 5.5
rHcy/rCys ^{a,b}	3.86 \pm 0.24	4.02 \pm 0.22	3.17 \pm 0.15	3.23 \pm 0.16
tHcy/tCys ^{a,c}	3.94 \pm 0.21	4.31 \pm 0.22	3.57 \pm 0.15	3.75 \pm 0.15
PLP (nmol $\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	81.5 (201.9)	89.9 (223.6)	74.5 (529.3)	92.1 (655.1)
Vitamin B ₁₂ (pmol $\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	342 \pm 21	375 \pm 21	696 \pm 77	745 \pm 95
Folate (nmol $\cdot\text{L}^{-1}$)	15.4 (34.2)	15.9 (26.1)	19.9 (36.7)	19.9 (36.2)
Creatinine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a	87.7 \pm 2.3	109.9 \pm 4.2	89.2 \pm 2.0	109.3 \pm 1.8

Values are means \pm SEM or median (P_{90}). Log-transformed data were used for PLP and folate.

^a Significant main effects from ANOVA: acute exercise.

^b Significant main effects from ANOVA: group.

^c Significant main effects from ANOVA: exercise \times group interaction.

PLP, pyridoxal-5'-phosphate; rCys, reduced Cys; rHcy, reduced Hcy; tCys, total Cys; tHcy, total Hcy.

After an incremental bout of specific exercise, the concentrations of aminothiols were increased regardless of the group considered, as shown in Table 2. Plasma concentrations were significantly higher than baseline values in tHcy ($17.7 \pm 1.5\%$; $F = 122$, $P < 0.001$) as well as in tCys ($9.9 \pm 1.6\%$; $F = 42.7$, $P < 0.001$). Likewise, reduced forms in plasma were increased after exercise $10.6 \pm 1.6\%$ for rHcy ($F = 39.2$, $P < 0.001$) and $7.6 \pm 2.2\%$ for rCys ($F = 9.4$, $P < 0.01$). Simultaneously, kayakers and cyclists showed significant elevations of PLP ($F = 15.6$, $P < 0.01$), vitamin B₁₂ concentrations ($F = 12.3$, $P < 0.001$), and creatinine ($F = 166$, $P < 0.001$) after acute exercises, but no changes were seen in folate. Groups showed significant differences in circulating concentrations of rHcy ($F = 5.4$, $P < 0.05$), tCys ($F = 8.5$, $P < 0.01$), and vitamin B₁₂ ($F = 15.6$, $P < 0.01$), whereas no differences were seen in the change with exercise (exercise \times group interaction) in aminothiols and vitamins.

To assess the relative prevalence of aminothiol changes in plasma, we calculated the respective ratios (Table 2). Ratios of rHcy to rCys ($F = 4.5$, $P < 0.05$) and tHcy to tCys ($F = 59.5$, $P < 0.001$) increased after exercise, although lesser variations were observed in the ratio of tHcy to tCys after cycling, according to the significant exercise \times group interaction ($F = 8.2$, $P < 0.01$).

The total plasma amino acid concentrations at rest were significantly higher in kayakers than in cyclists as a result

of the significant higher concentrations of most amino acids, and these concentrations were modified by the acute bouts of intense exercise (Table 3). In general, the differences were low between before and after exercise, except for Ala, which showed the highest increase ($F = 215$, $P < 0.001$). On the contrary, branched-chain amino acids decreased after exercise ($F = 6.4$, $P < 0.05$). The total plasma amino acid concentration was increased after exercise ($F = 24.6$, $P < 0.001$) mainly due to the increase of nonessential amino acids ($F = 86.5$, $P < 0.001$). However, changes in plasma concentrations with exercise were similar between sports, with the exception of a higher increase of taurine (Tau) in cyclists ($21.1 \pm 4.7\%$) compared that in kayakers ($7.8 \pm 3.3\%$; exercise \times group interaction, $F = 4.6$, $P < 0.05$).

Changes in plasma concentrations of reduced and total aminothiols after both types of exercise did not reach significant correlation with changes in free amino acids or baseline vitamins. On the other hand, changes in free amino acids showed a high degree of covariation, remaining reciprocally related one to each other. Provided that the extent of metabolic plasma changes with exercise was not significantly different between sports (except for Tau), we also correlated the pooled data of the two groups (Table 4). Accordingly, significant and positive correlations were seen among changes in aminothiols, with the exception of that of rHcy with tCys. Likewise, significant and positive correlations

TABLE 3. Plasma concentrations of relevant amino acids before and after exercise.

	Kayakers		Cyclists	
	Before	After	Before	After
Alanine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	302 \pm 14	492 \pm 18	256 \pm 22	427 \pm 21
Methionine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^b	32 \pm 1	33 \pm 2	26 \pm 1	25 \pm 1
Tau ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,c}	45 \pm 2	48 \pm 2	41 \pm 2	49 \pm 2
Aromatic amino acids ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^b	184 \pm 5	186 \pm 6	146 \pm 4	155 \pm 7
Branched-chain amino acids ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	430 \pm 12	401 \pm 16	334 \pm 15	307 \pm 18
Nonessential amino acids ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	1809 \pm 47	2112 \pm 54	1598 \pm 37	1870 \pm 43
Essential amino acids ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^b	1048 \pm 22	1027 \pm 35	811 \pm 26	793 \pm 33
Total amino acids ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ^{a,b}	3170 \pm 69	3451 \pm 84	2656 \pm 50	2913 \pm 66

Values are means \pm SEM.

^a Significant main effects from ANOVA: acute exercise.

^b Significant main effects from ANOVA: group.

^c Significant main effects from ANOVA: exercise \times group interaction.

TABLE 4. Correlations between percentages of change before and after exercise in pooled data ($n = 29$).

	rHcy	tHcy	rCys	tCys
tHcy	0.437*	—	—	—
rCys	0.647***	0.426*	—	—
tCys	0.305	0.723***	0.610***	—
PLP	0.579***	0.410*	0.534**	0.438*
Vitamin B ₁₂	0.426*	0.429*	0.470**	0.473**
Folate	0.337	0.198	0.315	0.235
Creatinine	0.349	0.381*	0.419*	0.528**

Spearman's rank correlation was used for PLP and folate; otherwise, Pearson correlation coefficient was used.

PLP, pyridoxal-5'-phosphate; reduced Cys; rHcy, reduced Hcy; tCys, total Cys; tHcy, total Hcy; rCys.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

were seen between changes in reduced and total aminothiols with changes in PLP and vitamin B₁₂ and with changes in plasma creatinine concentrations.

DISCUSSION

The main finding of this study indicates that the acute physical activity increased plasma concentrations of tHcy in association with an increase in rHcy, and this hyperhomocysteinemic effect seems to be independent of the type of exercise and the vitamin status. Moreover, after the specific tests for kayaking and cycling, no significant differences were seen among changes produced in plasma reduced and total Hcy and Cys and in its metabolically related vitamins. In general, these changes in plasma aminothiols were interrelated with each other and correlated positively with changes in PLP, vitamin B₁₂, and creatinine but not with changes in folate or amino acids.

According to the respective reduced and total ratios, plasma changes in Hcy concentrations with exercise exceed those observed in Cys in both groups. On the other hand, total and reduced aminothiol concentrations in plasma were similar to those reported in different studies using SBD-F (26,34) in healthy middle-age and older controls (rHcy 0.09 ± 0.03 and $0.17 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tHcy 11 ± 3 and $14.1 \pm 6.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively). Likewise, similar plasma concentrations were observed with other derivatization procedures, such as 4,4'-dithiopyridine (1) in healthy elderly subjects (rHcy $0.18 \pm 0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tHcy $14.1 \pm 4.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), monobromobimane (38) in healthy adults (rHcy $0.18 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tHcy $6.5 \pm 0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), or 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (4) in healthy controls (rHcy $0.11\text{--}0.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; tHcy $8.4\text{--}14.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). However, it has recently been observed that derivatization of reduced thiols by the SBD-F method could be affected by thiol exchange reactions (25); therefore, some artifact in the measured concentrations cannot be excluded in the present study.

Several lifestyle and physiological factors have been related to the variations of the circulating concentrations of tHcy (23), age, sex, diet, tobacco, alcohol, coffee, or regular physical activity. Therefore, the selection of the experimen-

tal groups in this study was directed to minimize the influence of those variables and, in fact, the increase in tHcy after kayaking and cycling occurred within the recommended ranges. On the other hand, comparison of both groups concerning anthropometrical data or training level showed significant differences that, however, did not affect the extent of plasma aminothiol changes in both exercises, pointing to hyperhomocysteinemia as an independent effect of the type of acute exercise studied.

The effect of acute exercise on plasma tHcy concentrations in active individuals has been examined in several studies. Increased plasma tHcy concentrations have also been observed in runners on treadmill after 30 min (39), marathon runners (10,22), swimmers after 3 wk of training (11), and athletes of triathlon after competition (15). On the contrary, some studies reporting plasma tHcy after an acute bout of exercise in a cycle ergometer have found no changes (27) or even decreases in trained subjects (9). It has been reported that the extent of change in plasma concentrations of tHcy depends on the type and duration of the exercise (10), as opposite to the present results, but discrepancies in data of tHcy within laboratories may be caused by different methodologies or experimental procedures. Thus, differences in the time of sampling after the cessation of the exercise may show temporal fluctuations in the tHcy concentrations, and there can also be changes in plasma volume when no corrections by appropriate formulas have been applied. In our study, a 30-min delay in sampling results in a prevalence of the hemodilution with plasma volume changes of $4.5 \pm 1.2\%$ in kayakers and $8.0 \pm 1.1\%$ in cyclists. These values are similar to those reported by Medved et al. (18) after 30 min of recovery of successive bouts of exercise until exhaustion on a cycle ergometer.

The effect of acute exercise on plasma rHcy has not received a deal of attention. Zinellu et al. (40) found lower concentrations of rHcy immediately after incremental cycle ergometer tests in two groups, athletes and sedentary subjects, whereas they did not observe equivalent changes in tHcy and they concluded that the change in Hcy after physical activity could be due to metabolic effects rather than redox thiol imbalances. Furthermore, in the same subjects, Sotgia et al. (27) have related these changes in plasma rHcy levels with the increase in plasma creatine concentrations observed.

These findings are apparently opposed to those observed in our study, showing increases of rHcy and tHcy 30 min after acute exercises, but different recovery periods after exercise in both experiments may explain the discrepancies. Dynamic changes in tHcy and tCys concentrations during incremental exercise and recovery has been described (9) with a significant fall in plasma during exercise and return to baseline values from the 2nd min of recovery until the 15th min. Conceivably, the longer period of recovery in our study could be responsible for the higher-than-baseline tHcy and rHcy concentrations observed. Thus, significant equivalent increases of 10% in plasma tHcy have been

observed 30 min after running on a treadmill (39) or 19% in marathon runners 24 h after finishing the race (22).

Resting plasma amino acid concentrations were within the range of previously reported values (17). These resting concentrations varied significantly between sports and differences may be due to minor variations in protein content of the diet before the overnight fast and to different body mass index or physical training. Acute tests of kayaking and cycling caused an increase in concentrations of nonessential and total amino acids, an effect that has also been observed in other studies (32) in the recovery period of a test in cycle ergometer. Interestingly, in both groups, changes in amino acid concentrations were equivalent, and no consistent correlations were shown among postexercise concentrations of reduced or total aminothiols and baseline or postexercise amino acids. These results seem not to support our assumption of the relationship between exercise-induced metabolic stress on amino acid metabolism and enhanced Hcy production.

Resting concentrations of folate, PLP, and vitamin B₁₂ seemed to be adequate in both groups of athletes, although consistently higher vitamin B₁₂ concentrations were observed in cyclists. Likewise, an increase in concentrations of PLP and vitamin B₁₂ occurred after respective bouts of physical exercise, the extent of which directly correlated with change in reduced and total aminothiols when the pooled data were considered to overcome the small number of athletes enrolled. The association of the increased postexercise tHcy with baseline concentrations of metabolically related B vitamins has been examined in previous studies, and contradictory inverse relationships have been reported, either with baseline folate after a sprint triathlon (15) or with resting vitamin B₁₂ after a high-intensity training in swimming (11). Differences in physical activities

and experimental models may explain those discrepancies. On the other hand, increased concentrations of PLP have been described after exercise in marathon runners and attributed to the mobilization of the hepatic and erythrocytic reservoirs (24); therefore, an association of independent effects of acute exercise on changes in plasma B vitamins and aminothiols cannot be excluded in our study.

Of note, changes in plasma creatinine concentration after physical activity have been related with a temporal reduction in renal blood flow and glomerular filtration rate (36). Likewise, the removal of Hcy by the kidney seems to be dependent on renal plasma flow (8) and, in fact, higher concentrations of reduced and total aminothiols (13,26) and increased ratios of tHcy to tCys (29) have been described in chronic renal disease. Accordingly, our observation of an association of plasma changes in aminothiols and creatinine with exercise could indicate an important role for the renal function in the increased aminothiols concentrations in the postexercise period.

In conclusion, our results show that higher plasma concentrations of tHcy after an acute intense exercise seems to be related with higher concentrations of rHcy presumably driven by cellular export, and this effect is independent of the type of exercise, vitamin status, or amino acid metabolic stress but could be related to potential changes in the renal function.

The authors thank the subjects who participated in the study and J. Muñoz of the Hospital San Agustín, for the technical assistance. We wish to express appreciation to J. Fernández Comins and J. Cousins for the manuscript language revision. This research was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria to RV (FIS 02/0665). The results of the present study do not constitute endorsement by ACSM.

Conflict of interest statement: All authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Andersson A, Lindgren A, Arnadóttir M, Prytz H, Hultberg B. Thiols as a measure of plasma redox status in healthy subjects and in patients with renal or liver failure. *Clin Chem*. 1999;45(7):1084–6.
- Batty GD, Lee IM. Physical activity and coronary heart disease. Fifty years of research confirms inverse relationships. *BMJ*. 2004;328(7448):1089–90.
- Blom HJ. Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(3):227–32.
- Campolo J, Caruso R, De Maria R, et al. Aminothiol redox alterations in patients with chronic heart failure of ischaemic or non-ischaemic origin. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007;8(12):1024–8.
- Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*. 1974;37(2):247–8.
- Dusitanond P, Eikelboom JW, Hankey GJ, et al. Homocysteine-lowering treatment with folic acid, cobalamin, and pyridoxine does not reduce blood markers of inflammation, endothelial dysfunction, or hypercoagulability in patients with previous transient ischemic attack or stroke. A randomized substudy of the VITATOPS trial. *Stroke*. 2005;36(1):144–6.
- Fernandez García B, Pérez Landaluce J, Rodríguez Alonso M, Terrados N. Intensity of exercise during road race pro-cycling competition. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(5):1002–6.
- Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, et al. Interorgan exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(4):E757–63.
- Gaume V, Mougin F, Figard H, et al. Physical training decreases total plasma homocysteine and cysteine in middle-aged subjects. *Ann Nutr Metab*. 2005;49(2):125–31.
- Herrmann M, Schorr H, Obeid R, et al. Homocysteine increases during endurance exercise. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(11):1518–24.
- Herrmann M, Wilkinson J, Schorr H, et al. Comparison of the influence of volume-oriented training and high-intensity interval training on serum homocysteine and its cofactors in young, healthy swimmers. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(11):1525–31.
- Hildebrandt W, Kinscherf R, Hauer K, Holm E, Dröge W. Plasma cystine concentration and redox state in aging and physical exercise. *Mech Ageing Dev*. 2002;123(9):1269–81.
- Hoffer LJ, Robitaille L, Elian KM, Bank I, Hongsprabhas P, Mamer OA. Plasma reduced homocysteine concentrations are increased in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2001;59(1):372–7.

14. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222(3):283–92.
15. König D, Bissé E, Deibert P, Müller H-M, Wieland H, Berg A. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B₁₂. *Ann Nutr Metab.* 2003;47(3-4):114–8.
16. Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem.* 2003;36(6):431–41.
17. MacLaren DP, Nevill AM, Thake CD, et al. Human erythrocyte and plasma amino acid concentrations during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32(7):1244–9.
18. Medved I, Brown MJ, Bjorksten AR, Leppik JA, Sostaric S, McKenna MJ. N-Acetylcysteine infusion alters blood redox status but not time to fatigue during intense exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2003;94(4):1572–82.
19. Mora S, Lee IM, Burning JE, Ridker PM. Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. *JAMA.* 2006;295(12):1412–9.
20. Pérez Landaluce J, Rodríguez Alonso M, Fernández Garcia B, Bustillo E, Terrados N. Aerobic power and anaerobic capacity in junior and senior women kayakers. *SA J Sports Med.* 2000;7:13–6.
21. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem.* 1999;45(2):290–2.
22. Real JT, Merchante A, Gómez JL, Chaves FJ, Ascaso JF, Carmena R. Effects of marathon running on plasma total homocysteine concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(2):134–9.
23. Refsum H, Nurk E, Smith D, et al. The Hordaland homocysteine study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr.* 2006;136(Suppl 6):1731S–40S.
24. Rokitzki L, Sagrados AN, Reuss F, Büchner M, Keul J. Acute changes in vitamin B₆ status in endurance athletes before and after a marathon. *Int J Sport Nutr.* 1994;4(2):154–65.
25. Santa T, Aoyama C, Fukushima T, Imai K, Funatsu T. Suppression of thiol exchange reaction in the determination of reduced-form thiols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with fluorogenic benzofurazan reagent, 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate and 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(6–7):656–61.
26. Sjöberg B, Anderstam B, Suliman M, Alvestrand A. Plasma reduced homocysteine and other aminothiols concentrations in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;47(1):60–71.
27. Sotgia S, Carru C, Caria MA, Tadolini B, Deiana L, Zinellu A. Acute variations in homocysteine levels are related to creatinine changes induced by physical activity. *Clin Nutr.* 2007;26(4):444–9.
28. Stead LM, Au KP, Jacobs RL, Brosnan ME, Brosnan JT. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(5):E1095–100.
29. Suliman ME, Divino Filho JC, Barany P, Anderstam B, Lindholm B, Bergstrom J. Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocytic sulfur amino acids in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(6):1287–96.
30. Talwar D, Quasim T, McMillan DC, Kinsella J, Williamson C, St J O'Reilly D. Optimisation and validation of a sensitive high-performance liquid chromatography assay for routine measurement of pyridoxal-5-phosphate in human plasma and red cells using pre-column semicarbazide derivatisation. *J Chromatogr B.* 2003;792(2):333–43.
31. Unt E, Zilmer K, Mägi A, Kullisaar T, Kairane C, Zilmer M. Homocysteine status in former top-level male athletes: possible effect of physical activity and physical fitness. *Scand J Med Sci Sports.* 2008;18(3):360–6.
32. Van Hall G, Saltin B, Wagenmakers AJ. Muscle protein degradation and amino acid metabolism during prolonged knee-extensor exercise in humans. *Clin Sci (Lond).* 1999;97(5):557–67.
33. Venta R, Fernández A, Gacimartín MV, Cándenas M. Validation of a method for rapid measurement of reduced forms of aminothiols in plasma based on SBD-F derivatization. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(Suppl):S312.
34. Ventura P, Panini R, Abbati G, Marchetti G, Salvioli G. Urinary and plasma homocysteine and cysteine levels during prolonged oral N-acetylcysteine therapy. *Pharmacology.* 2003;68(2):105–14.
35. Wald DS, Morris JK, Law M, Wald NJ. Folic acid, homocysteine, and cardiovascular disease: judging causality in the face of inconclusive trial evidence. *BMJ.* 2006;333(7578):1114–7.
36. Warburton DE, Welsh RC, Haykowsky MJ, Taylor DA, Humen DP. Biochemical changes as a result of prolonged strenuous exercise. *Br J Sports Med.* 2002;36(4):301–3.
37. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998;338(15):1042–50.
38. Williams RH, Maggiore JA, Reynolds RD, Helgason CM. Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other aminothiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clin Chem.* 2001;47(6):1031–9.
39. Wright M, Francis K, Cornwell P. Effect of acute exercise on plasma homocysteine. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998;38(3):262–5.
40. Zinellu A, Sotgia S, Caria MA, et al. Effect of acute exercise on low molecular weight thiols in plasma. *Scand J Med Sci Sports.* 2007;17(4):452–6.



apunts

MEDICINA DE L'ESPORT

www.apunts.org



REVIEW

New cardiovascular risk factors and physical activity

Nicolás Terrados^{a,*}, Gracia Valcárcel^b and Rafael Venta^{b,c}

^aRegional Sports Medicine Unit, Principality of Asturias, Municipal Sports Foundation of Avilés and Department of Functional Biology, The University of Oviedo, Spain

^bBiochemistry Service, Hospital San Agustín, Avilés, Spain

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, The University of Oviedo, Asturias, Spain

Received 16 March 2010; accepted 30 April 2010

Available online 6 July 2010

KEYWORDS

Cardiovascular risk factors;
Physical activity;
Homocysteinaemia;
Asymmetric dimethylarginine

Abstract

Recent research has suggested that a number of new cardiovascular risk factors should be added to the 'traditional' risk factors of hypercholesterolemia, hypertension, hyperglycaemia, nicotine poisoning, etc. Some of these non-conventional, 'emergent' conditions are related to plasma lipids whilst others, for example, markers of inflammation, homocysteinaemia, impaired fasting glycaemia and asymmetric dimethylarginine, are not. The emergent factors have obvious implications for preventative and therapeutic decisions. Physical exercise can have a modifying effect, though this is not, as yet, generally well known (especially with regard to homocysteinaemia and asymmetric dimethylarginine).

© 2010 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

PALABRAS CLAVE

Factores de riesgo cardiovascular;
Actividad física;
Homocisteinemia;
Dimetilarginina asimétrica

Los nuevos factores de riesgo cardiovascular y la actividad física

Resumen

Desde hace años se conocen varios factores de riesgo cardiovascular, llamados tradicionales, como son la hipercolesterolemia, la hipertensión, la hiperglucemia, el tabaquismo etc. Por otra parte, a lo largo de los últimos años han surgido con fuerza, estudios que proponen la introducción de nuevos factores de riesgo cardiovascular, no convencionales o «emergentes», varios de ellos relacionados con los lípidos plasmáticos, pero otros no, como son; los marcadores de inflamación, la homocisteinemia, la glucemia en ayunas alterada, y la dimetilarginina asimétrica. Con sus consiguientes implicaciones en las decisiones preventivas y terapéuticas. Estos factores de riesgo emergentes, también

*Corresponding author.

E-mail address: ntterrados@ayto-aviles.es (N. Terrados).

pueden ser modificados por el ejercicio físico, pero este efecto es poco conocido todavía, sobre todo en lo que respecta a la homocisteína y a la dimetilarginina asimétrica.

© 2010 Consell Català de l'Esport. Generalitat de Catalunya. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Introduction

A cardiovascular risk factor (CRF) is a biological characteristic or behaviour that increases the possibility of cardiovascular disease (CVD).¹ The concept of risk factors first appeared some fifty years ago with the publication of the Framingham Study.² Since that time, advances in the field of epidemiology have made large scale clinical studies possible and have led to the identification of a series of cardiovascular disease risk factors that induce the formation of atheromatous plaques. The establishment of a specific biological characteristic, environmental factor or habit as a CRF requires a standardised methodology; concordant prospective studies; an added effect when various risk factors concur in an individual; and that the modification of the factor (in the case that the factor is modifiable) results in a diminution of the risk (Table 1).³

Historically, there has been clear evidence of a series of 'traditional' CRFs, such as hypercholesterolemia, hypertension, hyperglycaemia, nicotine poisoning, sedentarism, etc., which have been used in the stratification of individual risk.⁴ In the recent past, a number of important studies have proposed the inclusion of new or 'emergent' CRFs in the evaluation and stratification of cardiovascular risk and this has implications for preventative and therapeutic strategies.

Numerous documents and reports that include recommendations for the prevention of CVD and control of the

main cardiovascular risk factors have been published by national and international scientific institutions and organisations (from the USA, Europe,⁵ etc.). Following the latest recommendations of the world renowned National Cholesterol Education Program (NCEP),⁴ Table 1 lists the most significant 'traditional' CRFs whilst Table 2 shows the 'emergent' factors. Some of the 'new' factors have been recognised for decades though they have been subject to debate and controversy and consensus has not been reached on their inclusion in cardiovascular risk evaluation.

The NCEP Panel III identifies three classes of CRFs that influence the possibilities of suffering CVD, although only the first two are relevant to the modification of treatment objectives: major CRFs, factors linked to lifestyles and emergent risk factors.

Panel III recognises that, in addition to the main CRFs, CVD is influenced by the presence of other factors whose modification can have a positive effect on some of the major CRFs and reduce risk; these therefore represent direct treatment objectives. These factors act through other intermediate elements or worsen independent risk factors such as, obesity, sedentarism, a family history of premature CVD, psychosocial conditions or being male. Although they do not figure in algorithm calculations on the stratification of risk,⁶ two of them, obesity and sedentarism, are considered as causal CRFs by the American Heart Association.

Table 1 Major ('traditional') cardiovascular risk factors.⁴

Age and sex (men ≥ 45 years old, women ≥ 55 years old)
Nicotine poisoning
Arterial hypertension (AP $\geq 140/90$ mmHg or undergoing antihypertensive treatment)
Increased LDL cholesterol
Fall in HDL cholesterol (< 40 mg/dl) ^a
Family history of premature coronary heart disease
Male first degree relatives < 55 years
Female first degree relatives < 65 years
Diabetes mellitus ^b
Lifestyle (overweight/obesity, sedentarism, atherogenic diet) ^c

AP: arterial pressure; HDL: high density lipoproteins; LDL: low density lipoproteins.

^aAdapted from the National Cholesterol Education Program (NCEP)⁴.

^bIf HDL cholesterol is ≥ 60 mg/dl, it is considered as a 'negative' risk factor".

^cDiabetes mellitus carries a risk equivalent to a secondary prevention situation.

^dThese factors are not computed in the algorithms for stratification of risk.

Traditional cardiovascular risk factors

Lipid risk factors

Hypercholesterolemia is one of the main cardiovascular risk factors that is modifiable. The *Multiple Risk Factor Intervention Trial* demonstrated the existence of a continuous and

Table 2 Emergent cardiovascular risk factors.

Lipid risk factors
Total cholesterol quotient/HDL cholesterol
Apolipoproteins
HDL subclasses
Triglycerides
"Small and dense" LDL particles
Residual or remnant lipoproteins

Non-lipid risk factors

Markers of inflammation
Homocysteinaemia
Impaired fasting glycaemia
Thrombogenic/hemostatic factors

HDL: high-density lipoproteins; LDL: low-density lipoproteins.

graded relationship between cholesterolemia and total mortality and mortality due to ischemic heart disease.⁷

The three main classes of lipoproteins are: low-density lipoproteins (LDLs); high-density lipoproteins (HDLs); and very low-density lipoproteins (VLDLs). There is another class of lipoproteins known as intermediate-density lipoproteins (IDLs) that is between VLDL and LDL, though in clinical practice, it is included in the LDL category.

With the exception of HDLs, which play a role in reverse cholesterol transport and therefore exercise a vasoprotector action, lipid particles are more atherogenic due to the more cholesterol that they transport. Chylomicrons carry such a small quantity of cholesterol that their increase in hyperchylomicronemia (type I dyslipidemia) is not associated with arteriosclerosis lesions. In contrast, with the accumulation of VLDLs, a fifth of which are made up of cholesterol, an increase in atherogenesis is observed. Given that LDLs are particles with a higher level of cholesterol, they are the main cause of atherogenesis when they are in excess.

Levels of HDL cholesterol are inversely related with the risk of CVD; they seem to play a protective role against the onset of atherosclerosis as they capture free cholesterol from the peripheric tissues such as the cells of the vascular wall. This cholesterol is transformed into cholesterol esters, a part of which is transferred to the VLDLs by the cholesterol esters transfer proteins (CETPs) and returned to the liver by IDLs and LDLs and another part is transferred directly to the liver by the HDL particles. The liver reuses the cholesterol for the synthesis of VLDLs, for the synthesis of bile salts or excretes it directly into the bile. Therefore, HDLs tend to reduce cholesterol levels.

Although LDLs receive most attention in clinical management, there is a growing body of evidence that indicates that VLDLs play an important role in atherogenesis.

Non-lipid risk factors

Hypertension

Hypertension is a principal and independent CRF, but its damaging effect is increased when associated with other coronary risk factors such as smoking, diabetes and dyslipidemia. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure defines hypertension as a systolic arterial pressure of ≥ 140 mmHg or diastolic ≥ 90 mmHg or the need for antihypertensive treatment.⁸ A number of studies, for example the Framingham study, have demonstrated an increase in total mortality and cardiovascular risk in cases of increased levels of arterial pressure (diastolic and systolic), with a continuous and gradual relationship.⁹⁻¹¹ The association applies to men and women, young and old alike.

Smoking

Smoking contributes to CVD. The relationship between smoking and the risk of CVD is dose dependent and affects men and women equally. Observational studies suggest that stopping smoking leads to a substantial reduction of the risk of a cardiovascular event.

Diabetes

Diabetes is defined as the presence of a level of glucose, on an empty stomach, more than, or equal to, 126 mg/dL.¹² The risk of cardiovascular disease is significantly increased for sufferers of diabetes mellitus type 1 and type 2.¹³ The increase of risk attributed to hyperglycaemia is independent of other risk factors such as obesity, overweight or dyslipidemia that are often observed in diabetics.

Mortality in 80% of diabetes mellitus patients is caused by complications associated with atherosclerosis with ischemic heart disease being responsible in 75% of cases.¹⁴ In addition, the risk of acute myocardial infarction in diabetes mellitus type 2 patients with no previous history of myocardial infarction is similar to non-diabetics who have previously suffered a heart attack.¹⁵

Although it is probable that strict control of diabetes reduces micro-vascular disorders and other complications such as renal disease and retinopathies, statistics relative to the effects of glycemic control on coronary episodes are uncertain. Diabetics often present dyslipidemia, characterised by moderate hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia with low concentrations of HDL cholesterol that involve increased cardiovascular risk. This is frequently associated with central obesity, hyperinsulinism and AHT. Therefore, the association of numerous CRFs explains why many individuals already exhibit disorders when they are diagnosed with diabetes mellitus.

Emergent cardiovascular risk factors

Apolipoproteins

Apolipoprotein A

Apolipoproteins are a group of proteins that are variably distributed among different lipoproteins. Apo A-I is the most abundant apolipoprotein in plasma and is nearly 90% of the HDL and 60–70% of the protein fraction of the sub-fractions HDL2 and HDL3, respectively. Apo A-I is initially synthesised in the liver and intestine as a protein precursor, which is degraded to its mature form in plasma; it is a simple polypeptide chain that contains 243 amino acids. It is the highest concentration protein component of HDL and participates in the reverse transport of cholesterol. The apolipoprotein apo A-II is the second highest concentration protein component of HDL, although it is absent in the HDL2 sub-fraction and plasma levels do not correlate with HDL-cholesterol levels.

The measurement of concentration of apo A-1 in serum perfectly reproduces the predictive value of coronary disease of concentration of HDL in serum. Nevertheless, this correlation is not valid in subjects with hypertriglyceridemia, in which the fraction of HDL is enriched with triglycerides and cholesterol is almost absent.

Results of some studies have shown that the relationship between apo B/apo A-1 is better for evaluating cardiovascular risk than the total cholesterol/HDL cholesterol relationship or LDL cholesterol/HDL.^{16,17} The number of particles and, in particular, the balance between them, that is to say, the apo B/apo A-1 relationship, may be more important than the lipid quantity carried by each particle.

Apolipoprotein B

B apolipoprotein is a protein of large molecular weight, present in chylomicrons and VLDL and LDL lipoproteins. There are two molecular forms in plasma, apo B-100 (apo B) and apo B-48. Apo B is a unique polypeptide chain of 4536 amino acids (one of the biggest plasma proteins), synthesised in the liver and secreted in VLDLs. It is quantitatively maintained during the conversion of VLDL to IDL until LDL, of which it is the only protein component, and for this reason, levels of apo B are correlated with levels of these lipoproteins. Studies have established the relationship between B concentrations in serum and cardiovascular risk.^{18–20}

Given that each particle of VLDL, IDL and LDL contains only one apo B molecule, its concentration in serum reflects the risk associated with all these atherogenic particles. Although considered as a risk factor by the NCEP, its determination is not recommended in clinical practice, due to the unavailability of clinical guides or risk stratification algorithms based on its concentration.

Nevertheless, from an experimental point of view, it can offer important additional information. Concentration of apo B in serum provides data on the number of particles, especially LDL particles, as they contain approximately 90% of total circulating apo B. It has been suggested that a LDL/decreased apo B relationship is an indicator of the predominance of small and dense LDL particles.²¹

The estimation of LDL cholesterol using the Friedewald formula is inexact when triglycerides levels are higher than 300 mg/dl and, if no validated direct method or ultracentrifugation is available, the concentration of apo B can be used as an alternative for the stratification of risk and the setting of therapeutic objectives.²² A modification of the Friedewald formula has been described for the calculation of LDL cholesterol that includes apo B. The LDL cholesterol obtained in this way has been shown to be more independent of hypertriglyceridemia than calculations made with the Friedewald formula.²³

Triglycerides

In spite of the evidence put forward by some epidemiological studies on the relationship between hypertriglyceridemia and incidence of CVD,^{24,25} results of other, more recent, multivariate works do not allow the definitive classification of triglycerides as an independent CRF.⁴ This is due to the close relationship between increased levels of triglycerides and other lipid CRFs (the presence of residual lipoproteins or remnants of VLDLs and chylomicrons in plasma, the predominance of 'small and dense' particles of LDL in plasma or decreased plasma concentration of HDL cholesterol), non-lipid CRFs (hypertension) and emergent CRFs (glucose intolerance, prothrombotic state). The NCEP Panel III believes that increases in levels of triglycerides (>200 mg/dL) are associated with a higher risk of CVD. It is also commonly associated with other lipid and non-lipid risk factors and indicates that therapeutic objectives should be based on lifestyle changes (loss of weight, physical exercise, stopping smoking). Aerobic exercise reduces levels of triglycerides and total cholesterol and may increase levels of HDLs, especially if accompanied by weight loss.

Lipoprotein (a)

In recent years, lipoprotein (a) has attracted enormous interest as a cardiovascular risk factor.^{26,27} Lp(a) is a spherical lipoprotein, rich in cholesterol esters and phospholipids. It has a composition that is similar to LDL and contains a specific glycoprotein, apolipoprotein (a), linked by a disulphide bridge to the apolipoprotein B-100. In addition, it has great structural homology to the plasminogen fibrinolytic proenzyme (Figure 1).²⁸

A variety of mechanisms that may explain the relationship between Lp(a) and cardiovascular disease have been described in published works. Firstly, it is argued that as Lp(a) is an LDL particle it plays a role in the initiation, progression and possible rupture of the atheromatous plaque. Secondly, it is suggested that this particle competes with the plasminogen particle and inhibits thrombolytic activity.²⁹ Finally, cell line studies with rats have shown that lipoprotein (a) inhibits NO synthesis.³⁰

Although an increase in the plasma concentration of Lp(a) implies a higher risk of CVD, mainly in individuals at greater global risk,³¹ the principal consensus documents, such as the NCEP Panel III and the latest European STORE project proposal³², do not include it among cardiovascular risk factors that are computable for the evaluation of overall risk. This is due to the fact that some studies do not corroborate independent prediction, based on Lp(a) levels, of suffering CVD^{33,34} and there is no evidence that elimination benefits the patient.³⁵

Ultra-sensitive CRP

The inflammatory process characterises all phases of atherothrombotic development. There are many studies that relate a variety of elements that intervene in the inflammatory process with the risk of CVD. These elements include the intercellular-1 adhesion molecule (ICAM-1); the vascular-1 adhesion molecule (VCAM-1); E-selectin; P-selectin; and proinflammatory cytokines, such as interleukine-6 (IL-6), and the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). All of the aforementioned have been shown to be predictors of CRFs.³⁶ In clinical practice, difficulties in determining these markers and the short half-life of these molecules in circulatory blood mean that it is not possible to include them in the daily clinical routine. Of the other

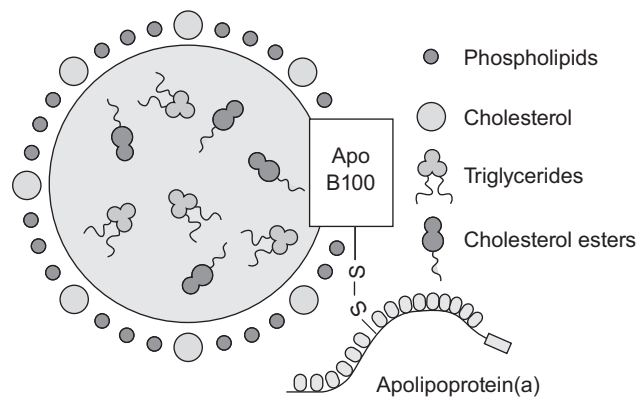


Figure 1 Structure of lipoprotein (a).

markers of inflammation that have been suggested, such as serum amyloid A, the leukocyte count, fibrinogen, nitrotyrosine, myeloperoxidase and c-reactive protein (CRP), only the latter has been consolidated as a candidate due to its stability, analysis precision and accessibility.³⁷ The AHA and CDC (Centers for Disease Control) say that of all the markers of inflammation, only ultra-sensitive CRP (US-CRP) has the characteristics necessary for use in clinical practice.³⁸

Ultra-sensitive CRP (US-CRP) is currently the best characterised inflammation biomarker and has been established as a potential marker of cardiovascular risk. US-CRP in plasma is a firm candidate for use in clinical practice as it is considered as an independent predictor of coronary illness for the general population, for both sexes and for patients who have already presented clinical manifestations of CVD.^{36,37}

CRP is a member of the pentraxin family of proteins, which are characterised by having a pentameric structure and radial symmetry, formed by five protomers of 24 kD and 206 amino acids that are linked among themselves by non-covalent bonds and have the capacity to bond to a great variety of substances, such as phosphocholine, fibronectin, chromatin, histones and ribonucleoproteins.³⁹

The differentiation of monocytes and macrophages that takes place during atherosclerotic process frees proinflammatory molecules, which include interleukin-6 (IL-6), which activates, in the liver, the liberation of inflammation markers like CRP. High levels (> 10 mg/dl) are registered in bacterial infections though ultra-sensitive analysis can detect very low levels (0–3 mg/dl) that are associated with the atherosclerotic process. Their half-life is more than 24 h and their blood levels are not altered by diet.

Homocysteine

In the last decade, numerous studies have been published that relate homocysteinaemia (Hcy) increases to CVD.^{40–44} Nevertheless, the mechanism that controls this relationship is not completely understood. Homocysteine has a direct cytotoxic effect on endothelial cells in cultivation. An alteration in endothelial function has been observed, evaluated by echo-Doppler, in individuals with moderate hyperhomocysteinaemia and improvements have been noted on reducing the concentration of homocysteine by means of folic acid treatment. It should be remembered that levels of plasma homocysteine are related to levels of vitamin B12 and folic acid.⁴⁵

Homocysteine can promote LDL oxidation through the production of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and studies have described the promotion of the multiplication of smooth muscle cells and a reduction in DNA synthesis in endothelial cells. A large number of prospective and retrospective studies support the hypothesis that an excess of plasma homocysteine is associated with a higher risk of coronary illness, peripheral and cerebrovascular disease.^{43,46–48}

Asymmetric dimethylarginine

The relationship established between a high concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial

dysfunction and the possible relationship between high ADMA values and the incidence of cardiovascular accidents has led a number of research groups to study the association between high ADMA and death by any cause.

Some studies indicate that ADMA plasma levels may predict the risk of cardiovascular events. In 2001, Valkonen et al.⁴⁹ showed that subjects with ADMA levels of more than 0.62 $\mu\text{mol/L}$ (percentile 75) had almost four times more risk of suffering an acute cardiovascular event. Similar results have been described by other authors in cases of patients with unstable angina; it was noted that those patients with higher ADMA levels (> 0,62 $\mu\text{mol/L}$, percentile 75) had five times more risk of suffering a cardiovascular event.⁵⁰

Zoccali et al.⁵¹ showed that in haemodialysis patients, ADMA plasma levels are an independent predictor of mortality and cardiovascular risk. In their multivariate study, only ADMA and age were significantly predictive, independent of the incidence of cardiovascular episodes (such as chest angina and heart attack) and death by any cause. Patients whose concentration of plasma ADMA was above the percentile 75 had three times more risk of suffering a cardiovascular episode than patients whose initial ADMA levels were lower than the average.

There are currently a number of case studies, controls and prospective clinical trials taking place with a variety of patient populations that are aimed at gaining greater understanding of the role of ADMA as an independent risk factor for CVD and mortality. The data generated by these studies will help determine the significance of ADMA as a risk factor and explore its diagnostic importance in different illnesses and diseases.

Cardiovascular risk factors and physical activity

There is much research on the effect of physical activity on the alteration of risk factors associated with heart disease. The most beneficial effect of exercise is on the level of oxidative metabolism, which influences levels of lipids in the blood. Although reductions in total cholesterol and LDL cholesterol generated by physical exercise seem to be relatively small (in general, they are less than 10%), there are important increases in HDL cholesterol and significant reductions in triglycerides. Transversal studies with sportspersons and non-sportspersons unequivocally demonstrate that individuals with higher levels of aerobic activity have higher HDL levels and lower levels of triglycerides. Nevertheless, results from longitudinal studies, over relatively long periods of time, are much less clear. Many studies on physical exercise have described the increase in HDL and the reduction in triglycerides but others have described very small changes or no changes at all. However, almost all studies have shown that proportions of LDL/HDL and total cholesterol/HDL fall after resistance training and this means less cardiovascular risk.

It must not be forgotten that one of the significant factors, both in terms of lipids and the other biochemical parameters expressed as a concentration, in the evaluation of changes engendered by physical exercise, is the change in the volume of blood that affects plasma concentrations, independently of changes in lipid totals. The failure to correctly take this factor into account could explain some of

the controversies concerning studies on CRFs and physical exercise.

There are reliable data that demonstrate the effectiveness of physical exercise on the reduction in blood pressure in patients with mild or moderate hypertension. Resistance training can reduce SAT and DAT by approximately 10 mmHg, in individuals with moderate essential hypertension.

With regard to the other traditional cardiovascular risk factors, physical exercise can play a role in the reduction and control of weight and in the control of diabetes. Exercise has also been shown to be effective in the control and reduction of stress and anxiety.⁵²

Whilst the effect of exercise on 'traditional' CRFs is well documented, the effect of exercise on 'emergent' CRFs has not been studied in depth and results are not well known.

The beneficial effects of exercise, leading to the reduction of levels of apolipoprotein B, have been widely reported, but this has not been the case with the relationship between exercise and levels of apolipoprotein A-1.^{53,54} Some authors have found that long-term, regular physical exercise does not seem to modify levels of apolipoproteins in comparison with sedentary groups.⁵⁵ There is relatively little information available on levels of lipoprotein (a) in young people although some studies have confirmed a favourable relationship between regular physical exercise and levels of lipoprotein (a).^{53,55}

The previously mentioned studies have been undertaken by different authors with different population groups and there are no published works that, at the same time, analyse the influence of intense physical exercise and the influence of continuous physical exercise (training) on levels of apolipoproteins A-1, B and lipoproteins (a), in the same population group.

The beneficial effects of physical exercise also seem to be related to the effect on the inflammatory process. In the short term, intense physical exercise produces a transitory inflammatory response, which is reflected in an increase in acute phase reactants and cytokines that is proportional to the amount of exercise and muscle damage. Nevertheless, regular physical activity (training) is associated with a chronic anti-inflammatory response that influences levels of acute phase reactants such as ultra-sensitive CRP and also affects lipids and lipoproteins.⁵⁶⁻⁵⁸

Some factors (BMI, sex of the subject, moment when the post-exercise sample is taken, diet, etc.) can have an influence on the response of ultra-sensitive CRP to physical exercise.⁵⁷ Another issue that must be taken into account is that many studies that have examined the effects of intense physical exercise on levels of ultra-sensitive CRP have not made a concentration correction in accordance with the changes in plasma volume after exercise.⁵⁷ Results should be individually corrected according to the post-exercise levels of hemoconcentration or hemodilution.⁵⁹

With regard to homocysteine, studies with large population groups have shown that regular physical exercise can reduce homocysteine plasma levels.^{46,60,61} However, other studies have concluded that intense physical exercise increases levels of Hcy.^{62,63} More recent studies, undertaken by our work group,⁶⁴ demonstrate increased plasma homocysteine levels, both in total and reduced, after intense exercise. This increase is independent of the type of exercise and the vitamin level but could be related to

changes in renal function.⁶⁴ The mechanism of this effect is not clearly understood though a study on alterations in the redox state of the homocysteine might lead to the comprehension of the underlying process. Furthermore, a study on its relationship with plasma concentrations of NO, ADMA and their proximate metabolites might lead to an understanding of how intense physical exercise produces an increase in levels of homocysteine, as long as regular, moderate physical exercise (training) seems to be a beneficial modulator of homocysteine. Also related to homocysteine is the proven fact that that regular physical exercise produces a series of beneficial effects on oxidative metabolism, which result in less oxidative stress and a greater defensive capacity against oxidative damage; this is caused by the increase in activity of endogenous antioxidant systems and the greater resistance of the LDL particles to oxidation.^{64,65} All this signifies a reduction in oxidised LDL levels and systematic markers of inflammation, as explained by Arquer et al.⁶⁵ in 2010.

In spite of the fact that the role of ADMA as a cardiovascular risk marker is reflected in an increasing number of clinical studies and scientific publications, no studies have looked at the effect of intense or sustained (training) physical exercise on ADMA plasma levels.

It is therefore recommended that studies should be undertaken on the effect of intense and sustained (training) physical exercise on emergent cardiovascular risk factors, especially on homocysteine and ADMA.

Conflict of interests

The authors have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work has been made possible by the support of the Ministry of Science and Innovation, Carlos III Institute of Health, FIS (PI020665).

References

1. Kannel W, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of risk in the development of coronary heart disease-six year follow-up experience. *Ann Intern Med.* 1961;55:33-50.
2. Dawber TR, Meadors GF, Moore Jr FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951;41:279-81.
3. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factors categories. *Circulation.* 1998;97:1837-47.
4. 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 Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *J Am Med Assoc.* 2001;285:2486-97.
5. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, et al.; Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force

- of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J.* 2003;24:1601–10.
6. Grundy SM. Primary prevention of coronary heart disease: integrating risk assessment with intervention. *Circulation.* 1999;100:988–98.
 7. Stamler J, Wentworth DN, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) *J Am Med Assoc.* 1986;256:2823–8.
 8. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413–46.
 9. MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet.* 1990;335:765–74.
 10. Staessen JA, Fagard R, Thijs L, Celis H, Arabidze GG, Birkenhäger WH, et al. Randomised double-blind comparison of placebo and active treatment for older patients with isolated systolic hypertension. The Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) Trial Investigators. *Lancet.* 1997;350:757–64.
 11. Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham Heart Study *Circulation.* 1999;100:354–60.
 12. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003;26(Suppl 1):S5–20.
 13. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study. *J Am Med Assoc.* 1979;241:2035–8.
 14. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis.* 1998;137(Suppl. 1):S65–73.
 15. Haffner SM, Letho S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type II diabetes and non diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229–33.
 16. Walldius G, Jungner I, Aastveit AH, Holme I, Furberg CD, Sniderman AD. The apo B/apo A-I ratio is better than cholesterol ratios to estimate the balance between plasma proatherogenic and antiatherogenic lipoproteins and to predict coronary risk. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42:1355–63.
 17. Walldius G, Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *J Intern Med.* 2006;259:493–519.
 18. Tornvall P, Bavenholm P, Landou C, de Faire U, Hamsten A. Relation of plasma levels and composition of apolipoprotein B-containing lipoproteins to angiographically defined coronary artery disease in young patients with myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88(5 Pt. 1):2180–9.
 19. Sniderman AD. Apolipoprotein B and apolipoprotein AI as predictors of coronary artery disease. *Can J Cardiol.* 1988;4(Suppl. A):24A–30A.
 20. Sedlis SP, Schechtman KB, Ludbrook PA, Sobel BE, Schonfeld G. Plasma apoproteins and the severity of coronary artery disease. *Circulation.* 1986;73:978–86.
 21. Wagner AM, Jorba O, Rigla M, Alonso E, Ordonez-Llanos J, Perez A. LDL-cholesterol/apolipoprotein B ratio is a good predictor of LDL phenotype B in type 2 diabetes. *Acta Diabetol.* 2002;39:215–20.
 22. Sniderman AD, Furberg CD, Keech A, Roeters van Lennep JE, Frohlich J, Jungner I, et al. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. *Lancet.* 2003;361:777–80.
 23. Planella T, Cortes M, Martinez-Bru C, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J. Calculation of LDL-cholesterol by using apolipoprotein B for classification of nonchylomicronemic dyslipemia. *Clin Chem.* 1997;43:808–15.
 24. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 1998;81(4A):7B–12B.
 25. Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *Eur Heart J.* 1998;19(Suppl. M):M8–14.
 26. Moliterno DJ, Lange RA, Meidell RS, Willard JE, Leffert CC, Gerard RD, et al. Relation of plasma lipoprotein(a) to infarct artery patency in survivors of myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88:935–40.
 27. Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PWF, et al. Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin Chem.* 1999;45:1039–46.
 28. Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science.* 1989;246:904–10.
 29. Rubies-Prat J. Lipoproteina(a): del genotipo al riesgo cardiovascular, pasando por el fenotipo. *Clin Invest Arterioscler.* 2004;16:151–3.
 30. Moeslinger T, Fiedl R, Volf I, Brunner M, Koller E, Spieckermann PG. Inhibition of nitric oxide synthesis by oxidized lipoprotein (a) in a murine cell line. *FEBS Lett.* 2000;478:95–9.
 31. Von Eckardstein A, Schulte H, Cullen P, Assmann G. Lipoprotein(a) further increases the risk of coronary events in men with high global cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:434–9.
 32. Backer RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003;24:987–1003.
 33. Nishino M, Malloy MJ, Naya-Vigne J, Russell J, Kane JP, Redberg RF. Lack of association of lipoprotein(a) levels with coronary calcium deposits in asymptomatic postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:314–20.
 34. Moliterno DJ, Jokinen EV, Miserez AR, Lange RA, Willard JE, Boerwinkle E, et al. No association between plasma lipoprotein(a) concentrations and the presence or absence of coronary atherosclerosis in African Americans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:850–5.
 35. Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute workshop on lipoprotein(a) and cardiovascular disease: recent advances and future directions. *Clin Chem.* 2003;49:1785–96.
 36. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836–43.
 37. Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:131–9.
 38. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon 3rd RO, Criqui M, et al.; Centers for Disease Control and Prevention; American Heart Association. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107:499–511.
 39. Healy H, Westhuyzen J. Biology and relevance of C-reactive protein in cardiovascular and renal disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30:133–43.
 40. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med.* 1998;49:31–62.
 41. Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:279–98.
 42. Malinow MR, Bostom AG, Krauss RM. Homocyst(e)ine, diet, and cardiovascular diseases: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. *Circulation.* 1999;99:178–82.

43. Bostom AG, Rosenberg IH, Silbershatz H, Jacques PF, Selhub J, D'Agostino RB, et al. Nonfasting plasma total homocysteine levels and stroke incidence in elderly persons: the Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1999;131:352–5.
44. Stehouwer CDA, Weijnenberg MP, van den Berg M, Jakobs C, Feskens EJM, Kromhout D. Serum homocysteine and risk of coronary heart disease and cerebrovascular disease in elderly men: a 10-year follow-up. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1895–901.
45. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:2002–6.
46. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvol I, Tverdal A, Nordrehaug E, et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *J Am Med Assoc.* 1995;274:1526–33.
47. Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Wilson PW, Schaefer EJ, Malinow MR. Plasma homocyst(e)ine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1990;16:1114–9.
48. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC, Newcomer LM, Upson B, Ullmann D, et al. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *J Am Med Assoc.* 1992;268:877–81.
49. Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimäki T, Laakso J, et al. Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet.* 2001;358:2127–8.
50. Lu TM, Ding YA, Lin SJ, et al. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2003;24:1912–9.
51. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet.* 2001;358:2113–7.
52. Petruzzello SJ, Landers DM, Hatfield BD, Kubitz KA, Salazar W. A meta-analysis on the anxiety-reducing effects of acute and chronic exercise. Outcomes and mechanisms. *Sports Med.* 1991;11:143–82.
53. Taimela S, Viikari JS, Porkka KV, Dahlen GH. Lipoprotein (a) levels in children and young adults: the influence of physical activity. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Acta Paediatr.* 1994;83:1258–63.
54. Mackinnon LT, Hubinger LM. Effects of exercise on lipoprotein(a). *Sports Med.* 1999;28:11–24.
55. Thomas NE, Baker JS, Davies B. Established and recently identified coronary heart disease risk factors in young people: the influence of physical activity and physical fitness. *Sports Med.* 2003;33:633–50.
56. Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1563–9.
57. Plaisance EP, Grandjean PW. Physical activity and high-sensitivity C-reactive protein. *Sports Med.* 2006;36:443–58.
58. Gonzales-Ordóñez AJ, Venta R, Terrados N, Arias A, Macías-Robles MD. Association between sensitivity for activated protein C (APC) and lipid or lipoprotein levels. *Thromb Haemost.* 2002;88:1069–70.
59. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumen of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol.* 1974;37:247–8.
60. Bailey D, Davies B, Baker J. Training in hipoxia: modulation of metabolic and cardiovascular risk factors in men. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1058–66.
61. König D, Bissé E, Deibert P, Müller H-M, Wieland H, Berg A. Influence of training volume and acute physical exercise on the homocysteine levels in endurance-trained men: interactions with plasma folate and vitamin B12. *Ann Nutr Metab.* 2003;47:114–8.
62. Wright M, Francis K, Cornwell P. Effect of acute exercise on plasma homocysteine. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998;38:262–5.
63. De Créé C, Malinow MR, van Kranenburg GP, Geurten PG, Longford NT, Keizer HA. Influence of exercise and menstrual cycle phase on plasma homocyst(e)ine levels in young women—a prospective study. *Scand J Med Sci Sports.* 1999;9:272–8.
64. Venta R, Cruz E, Valcárcel G, Terrados N. Plasma vitamins, amino acids, and renal function in postexercise hyperhomocysteinemia. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41:1645–51.
65. Arquer A, Elosua R, Marrugat J. Actividad física y estrés oxidativo. *Apunts Med Esport.* 2010, doi: 10.1016/j.apunts.2009.12.002.

