



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Efeitos da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores salivares de intensidade de exercício e estresse oxidativo, e variáveis hemodinâmicas de homens fisicamente ativos.

Aluno: Eduardo Felipe Menezes Simões

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA – MG

2015



Efeitos da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores salivares de intensidade de exercício e estresse oxidativo, e variáveis hemodinâmicas de homens fisicamente ativos.

Aluno: Eduardo Felipe Menezes Simões

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Morais Puga

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área: Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S593e
2015 Simões, Eduardo Felipe Menezes, 1988
 Efeitos da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores salivares de intensidade de exercício e estresse oxidativo, e variáveis hemodinâmicas de homens fisicamente ativos / Eduardo Felipe Menezes Simões. - 2015.
 64 f. : il.

 Orientador: Foued Salmen Espindola.
 Coorientador: Guilherme Morais Puga.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Bioquímica - Teses. 2. Stress oxidativo - Teses. 3. Saliva - Teses. 4. Exercícios físicos - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Puga, Guilherme Morais, . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



Efeitos da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores salivares de intensidade de exercício e estresse oxidativo, e variáveis hemodinâmicas de homens fisicamente ativos.

ALUNO: Eduardo Felipe Menezes Simões

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Miguel Mauricio Diaz Gomez

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira

Data da Defesa: 30/07/2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



A minha mãe, Tânia Menezes, por nada mais do que tudo o que me fez e faz até hoje. Ao Foued Espindola pela oportunidade e confiança.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, principalmente a minha mãe e ao meu padrasto Meraldo, pela força dada e preocupação demonstrada. Ao professor Foued Espindola pela oportunidade que me foi dada e pelas orientações que foram de grande valia. Aos meus colegas de laboratório Leonardo, Renata, Allisson pela ajuda dada durante todo este trabalho e principalmente a Olga, pela amizade e força durante todo o experimento realizado. Ao Miguel pelos momentos de conhecimento. A Mônica Torres por toda a força dada desde o início da minha estadia na cidade.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Sumário

Apresentação	1
Capítulo 1	3
Funções e propriedades do Óxido Nítrico	4
Produção enzimática e não-enzimática de Óxido Nítrico	6
Saliva, Óxido Nítrico e Exercício	9
Estresse Oxidativo, Óxido Nítrico e Exercício	12
Referências	14
Capítulo 2	21
Abstract	22
Introduction	24
Methods	25
Subjects	25
Design	26
Supplementation	26
Incremental Test	27
Main Tests	27
Saliva sampling and handling	27
Statistic Analyses	30
Results	30
Salivary $[NO_2]$	31
Heart Rate	31
Systolic and Diastolic Blood Pressure	31
Exercise Intensity Biomarkers	32
Oxidative Stress Markers	32
Discussion	33
References	37
Figures and legends	42
Anexos	53



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Lista de Abreviaturas

AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
ATP	Trifosfato de adenosina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
Ca ²⁺	Cálcio
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
FAD	Flavinaadenina dinucleotídeo
FMN	FlavinaMononucleotídeo
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO [•]	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintaseindutível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PKG	Proteína quinase dependente de cGMP
[]	Concentração



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Lista de Tabelas

Table 1.

Baseline characteristics and maximal load.....	28
--	----

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Ciclo enterosalivar do nitrato - Esquema mostrando a conversão do nitrato ingerido por meio da dieta em óxido nítrico.....	07
---	----

Capítulo 2

Figure 1. Eschematic representation of the experimental design.....	38
Figure 2. Salivary [NO ₂ ⁻] after AC and FD treatments of NO and PL groups.....	39
Figure 3. Heart rate profile during AC and FD treatments.....	40
Figure 4. Change (Δ) relative blood pressure to supplementation baseline in AC and FD treatments.....	41
Figure 5. Salivary [lactate] during AC and FD treatments. Area under curve of AC and FD treatments.....	42
Figure 6. Salivary [TP] during AC and FD treatments. Area under curve of AC and FD treatment.....	43

Figure 7. Alpha-amylase concentration relative pixels during AC and FD treatments.....	44
Figure 8. Salivary [Uric Acid] during AC and FD treatments. Area under curve in AC and FD treatments.....	45
Figure 9. Total antioxidant capacity (FRAP) during AC and FD treatments. Area under curve in AC and FD treatments.....	46
Figure 10. Lipid Peroxidation (TBARS) during AC and FD treatments. Area under curve in AC and FD treatments.....	47
Figure 11. Salivary SOD activity during AC and FD treatments. Area under curve in AC and treatments.....	48

Apresentação

Nitrato (NO_3^-) é um componente presente em vários fluídos biológicos de humanos, como na saliva, sangue, suor e lágrimas. Este pode ser reduzido à nitrito (NO_2^-) e posteriormente convertido à óxido nítrico (NO^*), uma molécula gasosa que possui papel importante em vários processos dos sistemas nervoso, imunológico e cardiovascular. Especificamente sobre estes efeitos, o NO^* participa da regulação da pressão arterial (PA), homeostase da glicose e do cálcio, contratilidade muscular, função plaquetária, angiogênese, e no sistema nervoso, como um neurotransmissor, atuando na formação da memória.

Por outro lado, existe uma condição a qual nosso organismo sofre danos moleculares, provinda de um efeito negativo sob o status redox. Tal processo é chamado de “estresse oxidativo”, onde a produção de agentes antioxidantes e oxidantes encontra-se desequilibrada. Dentre outros estímulos hipertensivos, o estresse oxidativo leva a um aumento inicial da PA. Sabendo que o NO^* atua positivamente no ambiente vascular, alguns estudos têm encontrado redução da PA após a suplementação com nitrato. Entretanto, os efeitos da sua suplementação sobre o estresse oxidativo ainda não estão completamente esclarecidos.

A partir deste cenário, vê-se a necessidade de um estudo da suplementação com nitrato a fim de avaliar seu efeito sobre biomarcadores de estresse oxidativo e de intensidade de exercício, bem como na pressão arterial. Assim, o presente estudo teve como objetivo a avaliação dos efeitos da suplementação com nitrato de sódio, durante cinco dias, sobre biomarcadores de intensidade de exercício, estresse oxidativo e PA em homens fisicamente ativos.

A apresentação da dissertação foi dividida em dois capítulos, conforme as normas do Instituto de Genética e Bioquímica e, a formatação seguiu as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT. No capítulo 1, é apresentada uma revisão bibliográfica do assunto. Já no capítulo 2,

mostramos a metodologia utilizada, os resultados obtidos e a discussão sob a forma de um artigo, que será submetido a uma revista científica indexada.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

Funções e propriedades do Óxido Nítrico

Óxido nítrico é uma molécula gasosa, de sinalização, que possui baixa solubilidade em soluções aquosas e também considerado um radical, porém não tão reativo como outras espécies de radicais (Butler, Flitney e Williams, 1995). Suas funções estão situadas em vários sistemas do nosso organismo. Na vasodilatação dependente do endotélio, o NO[•] é considerado como um mediador, no qual sua ação se dá através do sistema arginina-NO-cGMP (Lee, 2000). Funções no ambiente vascular também são atribuídas a uma das enzimas responsáveis pela síntese de NO[•], a NO sintase endotelial (eNOS), onde sua atividade para a manutenção da função cardiovascular é crucial (Totzeck *et al.*, 2012). Esta enzima pode ser ativada através de um processo fisiológico, via força de cisalhamento, ou por moléculas de sinalização, como bradicinina, adenosina, fator de crescimento endotelial vascular endotelial e serotonina (Deanfield, Halcox e Rabelink, 2007). No cérebro adulto, o NO atua como mediador da resposta neurogênica na proliferação de células neonatais durante a neurogênese (Carreira *et al.*, 2015).

A importância do endotélio para com o tônus vascular já está bem estabelecida. Nele, moléculas responsáveis pela dilatação e constrição do vaso são produzidas e liberadas para a manutenção da saúde vascular. Estes processos “controlam” o suprimento de oxigênio para os tecidos, bem como a demanda metabólica. Mostrando uma interligação entre saúde vascular e fluxo sanguíneo cerebral, por exemplo, evidências do efeito positivo do NO[•] no ambiente cerebrovascular foram encontradas em alguns trabalhos (Presley *et al.*, 2011); (Bond *et al.*, 2013). Além disso, sabe-se também que doenças cardiovasculares sofrem influência relacionadas à atividade da eNOS, que desta forma, propõe um importante papel do NO[•] sobre o desenvolvimento de tais eventos (Forstermann e Munzel, 2006).

Sabendo que o NO[•] é o mediador predominante da homeostase vascular (Iantorno *et al.*, 2014) e que o endotélio possui um importante papel no equilíbrio da saúde vascular (Deanfield, Halcox e Rabelink, 2007), talvez esta seja uma explicação do aumento sobre o estudo deste radical nas últimas

décadas. Além da sua função no relaxamento vascular, outra contribuição encontra-se na inibição da agregação plaquetária. Estes dois processos compartilham o mesmo mecanismo de ação no qual a síntese de NO^{*} pelo endotélio leva à ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) e um consequente aumento da concentração de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (Evora *et al.*, 2012).

A produção de cGMP pela ligação do NO^{*} ao heme da sGC pode ser regulada alostericamente pelo GTP ou ATP. O aumento dos níveis de cGMP levará a três eventos – ligação à fosfodiesterases, canais iônicos e à proteína quinase dependente de cGMP (PKG) – que estão envolvidos não somente a mecanismo de vasodilatação e agregação plaquetária, mas também de neurotransmissão (Derbyshire e Marletta, 2009). Exatamente sobre o mecanismo de vasorelaxamento, duas explicações são dadas atualmente. Umbrello *et al.*, (2013) explicam que através do aumento nos níveis de cGMP, proteínas quinases são ativadas modulando as atividades quinases e fosfatases da cadeia leve da miosina causando vasorelaxamento por uma menor fosforilação da miosina. Ainda segundo estes autores, por outro lado, o NO^{*} causa vasodilatação por uma redução do tônus vascular. Este mecanismo ocorre via hiperpolarização da membrana plasmática causada pelo efluxo de potássio. Este é causado pela abertura dos canais de potássio sensíveis ao cálcio e ATP, sob a ação do cGMP.

Além disso, esta molécula de sinalização também está envolvida com processos do sistema nervoso. Para tal afirmação, um recente estudo mostrou a participação do NO^{*} como um forte modulador da transmissão de sinapse inibitória (Yassin *et al.*, 2014). Na verdade, quando a síntese de NO é derivada da NO-sintase neuronal (nNOS), esta molécula atua como um neurotransmissor associado à diversos eventos importantes para o nosso sistema neural, como plasticidade neuronal, transmissão dos sinais de dor e liberação de neurotransmissor (Garry *et. al.*, 2015). Ainda no sistema nervoso central, além das funções acima citadas, o NO participa na formação de memória, no comportamento reprodutivo tanto feminino quanto masculino, além de funções motoras e sensoriais (Garthwaite, 2008).

Está bem descrito na literatura que o NO possui um papel importante na limitação de injúria oxidativa em células de mamíferos (Wink et. al., 2001). O estresse oxidativo é uma situação pela qual há um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, ex.: superóxido e peróxido) e a habilidade dos sistemas biológicos em combater intermediários reativos (Lay et. al., 2014), ou seja, um desequilíbrio na produção de moléculas antioxidantes e oxidantes. Desta forma, a produção de ROS atua de forma impactante na manutenção da homeostase vascular. Neste caso, o superóxido (O_2^-) gera peroxinitrito ($ONOO^-$) – concomitante oxidação de um dos co-fatores da eNOS – ao inibir a liberação de NO pelas células endoteliais, no qual acarretará um desacoplamento da eNOS (Sharma, Bernatchez and De Haan, 2012). Este desacoplamento diminui a capacidade da eNOS em produzir NO, podendo estar envolvido com os níveis elevados de superóxido (Ding, Aljofan and Triggle, 2007).

Produção enzimática e não-enzimática de Óxido Nítrico

O NO é sintetizado endogenamente/enzimaticamente sobre o comando da NO sintase (NOS) (Stuehr, 1999), que possui três diferentes isoformas: óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Em tal reação, ocorre a catálise de L-arginina, oxigênio e NAPH para a geração de NO, citrulina e NADP. Assim como diversas enzimas, a família da NO sintase necessita de co-fatores para exercerem sua atividade. Além do NADPH, FAD e FMN, calmodulina (CaM) e tetrahydrobiopterina (BH_4) formam um complexo de co-fatores os quais estão localizados no domínio amino-terminal oxidase ou carboxi-terminal redutase.

Os diversos locais de expressão destas isoformas, confere ao NO funções distintas. A eNOS é expressa no endotélio vascular e com isso, a manutenção da microcirculação cerebral e redução da proliferação do tecido muscular liso fazem parte das ações do NO sintetizado por esta isoforma (Garry et. al., 2015). Ainda de acordo com estes autores, a nNOS e iNOS são expressas em células neuronais e macrófagos, células da glia e células

tumorais, respectivamente. O NO quando derivado da nNOS tem um importante papel na neurotransmissão em associação com plasticidade neuronal, formação de memória, transmissão dos sinais da dor, dentre outros (Garry et al., 2015). O que difere entre estas isoformas é o fato da dependência de cálcio (Ca^{2+}). Enquanto a eNOS e nNOS são constitutivamente expressas e dependentes de Ca^{2+} , a iNOS é expressa em altos níveis após indução por agentes inflamatórios e não-dependente de Ca^{2+} (Andrew and Mayer, 1999).

Outro mecanismo importante que desempenha um papel no desenvolvimento de algumas doenças está relacionado ao desacoplamento da eNOS. Este quadro é caracterizado pelo desacoplamento da eNOS a partir do BH_4 , o qual é favorecido sobre condições isquêmicas resultando na geração de O_2^- ao invés do NO. A reação do O_2^- com o NO formará ONOO^- , que é uma neurotoxina, diminuindo a biodisponibilidade de NO (Garry et al., 2015). Tal comprometimento foi encontrado em pacientes com disfunção endotelial derivada da hipercolesterolemia e diabetes (Li et al., 2014). Além disso, sabe-se que a redução da biodisponibilidade de NO pode contribuir para quadros como hipertensão e aterosclerose.

Como já mencionado, a via enzimática da síntese de NO é dependente de O_2 , bem como a maioria da geração de ATP para o metabolismo celular. Tendo em vista que a saturação de O_2 , a capacidade de transporte do mesmo e o fluxo sanguíneo são fatores determinantes do fornecimento desta molécula às células, uma forma de perceber a redução de tal fornecimento seria de grande valia para manter níveis apropriados de O_2 nas células. Contudo, existe um fator que possui um importante papel na resposta à hipóxia que sofre influência do NO, o fator de hipóxia induzível (HIF), que fornece um mecanismo de resposta intracelular sensível à redução de O_2 (Semenza, 2012).

Entretanto, o NO também é sintetizado não enzimaticamente, favorecido em condições de hipóxia, através do sistema de redução nitrato-nitrito-NO. Nesta via, bactérias anaeróbicas facultativas presentes na cavidade bucal utilizam o nitrato (NO_3^-) como aceptor final de elétrons (alternativo ao processo de respiração celular) reduzindo-o à nitrito (NO_2^-). O nitrito segue ao estômago, onde, devido ao ambiente ácido, poderá ser reduzido ao NO e outras espécies

intermediárias reativas de nitrogênio (Lundberg and Weitzberg, 2010). Uma parte do nitrito é absorvida no intestino que posteriormente entrará na circulação aumentando sua concentração no sangue. Através do transporte ativo, tanto o nitrato quanto o nitrito serão captados da corrente sanguínea às glândulas salivares. No geral, aproximadamente 25% do nitrato provindo da dieta são captados pelas glândulas salivares. Na nossa dieta, os vegetais são fontes importantes de nitrato, sendo rúcula, alface, beterraba e espinafre os que possuem maiores concentrações de nitrato (Hobbs et al., 2013).

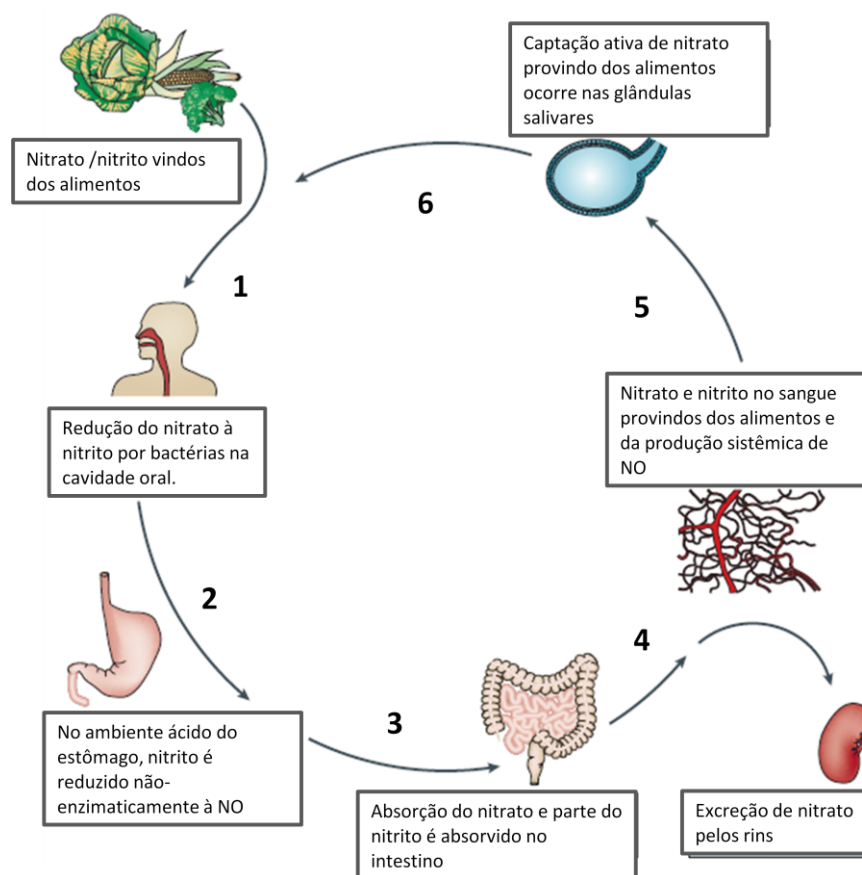


Figura 1 – Circulação enterosalivar do nitrato. (1) Na cavidade oral, o nitrato derivado da dieta é reduzido à nitrito através das bactérias locais. (2) redução do nitrito à NO no ambiente ácido do estômago, onde (3) parte do nitrato e o nitrito que não foi convertido a NO são absorvidos pelo intestino e, então, (4) o nitrato é excretado pelos rins. (5) o nitrato e o nitrito presentes na corrente sanguínea que são originados a partir da produção sistêmica de NO são (6) captados de forma ativa a partir da corrente sanguínea para as glândulas salivares dando reinício ao ciclo. Traduzida e adaptada de Lundberg, Weitzberg and Gladwin (2008).

Saliva, Óxido Nítrico e Exercício

Sendo produzida por três maiores glândulas, parótida, submandibular e sublingual, além de outras centenas menores (Punyadeera, 2013), a saliva possui diversas funções que compreende aspectos como emulsificação de alimentos, proteção contra cáries, ação antibacteriana, dentre outras. Através do transporte ativo ou por difusão passiva, componentes do sangue como proteínas, peptídeos e hormônios podem ser encontrados na saliva, classificando-a assim, como um possível ultra filtrado do sangue (Punyadeera, 2013). Entretanto, componentes presentes na saliva podem ser provindos não apenas do sangue, mas também por secreção das próprias glândulas salivares.

Quando comparada ao sangue, a saliva possui diversas vantagens em relação ao seu método de coleta, como por exemplo, o caráter não invasivo, a facilidade de manuseio, além da facilidade de coleta sem ajuda de um profissional especializado. Com isso, a utilização da saliva para monitoramento durante o exercício físico tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas.

Segundo Lundberg & Govoni (2004), a saliva contém concentrações de nitrato cerca de 10 a 20 vezes mais do que no plasma. A utilização da suplementação com nitrato ou dietas ricas em nitrato tem recebido bastante atenção tanto no que se refere a doenças quanto em situações de exercício. Tais estratégias possuem o objetivo de aumentar a concentração de nitrito (Webb et al., 2008), proporcionando a avaliação dos efeitos do NO. O exercício mesmo de forma aguda parece também aumentar a concentração de nitrito/NO (Maeda et al., 2004; Santana et al., 2013), talvez através do estresse de cisalhamento causado pelo aumento da velocidade do fluxo sanguíneo induzido pelo exercício.

Um dado interessante foi recentemente encontrado por Diaz et al. (2013) através de análises plasmáticas e salivares de atletas. Neste estudo, houve uma correlação entre NO_2^- salivar e níveis séricos de lactato desidrogenase e creatina kinase (marcadores de lesão muscular), sugerindo a utilização de NO

na saliva como um possível marcador de intensidade de exercício e que talvez seja mais um importante papel do NO em situações de exercício.

Estudos vêm demonstrando possíveis efeitos do NO sobre a pressão arterial e alguns parâmetros relacionados à capacidade de exercício de atletas e não-atletas. Ao suplementar nove homens treinados com 0.1 mmol de nitrato de sódio, Larsen et al. (2007) encontraram redução significativa na pressão arterial quando comparado ao grupo controle (cloreto de sódio) após três semanas de suplementação. Um efeito parecido foi encontrado por Kapil et al., (2014) ao suplementar 21 sujeitos com nitrato de potássio, o qual encontraram uma redução tanto da pressão arterial sistólica quanto da diastólica durante 24 horas de coleta. Em ambos os estudos acima citados, a redução da pressão arterial parece ter sido acompanhada por um aumento da concentração de nitrito. Avaliando o efeito do nitrato na pressão arterial e índice de resistência cerebrovascular, Bond et al. (2013) suplementaram doze mulheres saudáveis com 500 mL de suco de beterraba – o qual possui concentrações consideráveis de nitrato – e as submeteram à um teste progressivo na bicicleta. Como resultados, os pesquisadores encontraram redução significativa na pressão arterial sistólica e no índice de resistência da artéria cerebral média no grupo beterraba e sugeriram nitrato como um possível tratamento para hipertensão.

Se tratando de parâmetros relacionados à capacidade de exercício e performance, os trabalhos têm mostrado um efeito positivo da suplementação com nitrato, sendo ela orgânica ou inorgânica. Bailey et al. (2010) avaliaram o efeito da suplementação com 0.5 L de suco de beterraba como fonte de nitrato após o exercício de extensão de joelho, afim de elucidar mecanismos que explicassem a redução do custo de O_2 durante o exercício. Como resultado, através de uma eletromiografia integrada, eles encontraram uma melhora na tolerância ao exercício de alta intensidade sendo reflexo da redução atenuada da concentração muscular de fosfocreatina e redução do custo de O_2 .

Em outro estudo, buscando avaliar o efeito agudo e crônica da suplementação com nitrato, oito sujeitos saudáveis receberam durante quinze dias 0.5L de suco de beterraba (5.2 mmol de nitrato por dia) ou 0.5L de suco de groselha preta como placebo. Os indivíduos realizaram o teste no ciclo

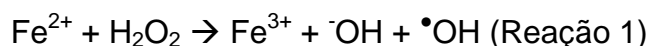
ergômetro, pedalando em intensidade moderada a 90% do limiar de troca gasosa. Além do aumento da concentração plasmática de nitrito, os autores encontraram uma redução significativa da pressão arterial e do custo de O₂, sugerindo o efeito agudo da suplementação nestes parâmetros sendo mantido por pelo menos quinze dias (Vanhatalo et al., 2010).

Entretanto, resultados de outros trabalhos vão de encontro com tais resultados citados acima. Bescós et al. (2012) suplementaram treze homens ciclistas atletas não-profissionais com nitrato de sódio (10mg.Kg⁻¹ de massa corporal) e o placebo foi cloreto de sódio na mesma concentração. A duração da suplementação foi de três dias. O teste consistiu em pedalar o máximo de distância possível durante 40 minutos. Como resultado, estes autores encontraram nenhuma diferença na performance dos atletas diante a suplementação com nitrato. Outros três trabalhos encontraram o mesmo resultado, concluindo que a suplementação com nitrato sendo ela orgânica ou inorgânica não melhorou a performance dos participantes (Larsen et al., 2010; Bescós et al., 2011; Wilkerson et al., 2012).

Para tentar explicar tais divergências entre os possíveis efeitos da suplementação em relação à performance, alguns aspectos precisam ser discutidos. O primeiro diz respeito ao tempo total que a suplementação foi administrada. Os trabalhos têm evidenciado que para que haja algum efeito na performance, a suplementação deve ser considerada pelo menos por sete dias. O segundo aspecto diz respeito ao tipo de teste a ser utilizado, englobando o tempo de duração e a intensidade aplicada, já que tem sido sugerido que a via nitrato-nitrito-NO é principalmente ativada sobre condições de acidez e anaeróbicas. Outros dois aspectos se referem ao nível de condicionamento e ao aumento do nitrito no plasma após a ingestão.

Estresse Oxidativo, Óxido Nítrico e Exercício

Alguns mecanismos são conhecidos por produzirem potenciais oxidantes, como por exemplo: A reação de Fenton (reação 1), um processo que gera radicais hidroxila com alto potencial de oxi-redução; as espécies reativas de nitrogênio (RNS, ex.: peroxinitrito); e a peroxidação lipídica (cascatas de reações providas de radicais livres).



O NO exerce sua propriedade antioxidante ao eliminar os oxidantes produzidos na reação acima, os equivalentes redutores fornecidos pelo superóxido (O_2^-) ou também prevenindo a reação do peróxido (Wink et al., 2001). Entretanto, estas ações por parte do NO parece ter duas “faces”. Peroxinitrito (ONOO^-), que possui um caráter oxidante, pode ser gerado através da reação do NO com o O_2^- , mas este tipo de reação parece ter uma relação com taxa relativa de produção destes dois radicais.

No nosso organismo, a produção de ROS acontece a todo tempo, porém em níveis que não são lesivos a qualquer estrutura que compõe nossos sistemas. Isso fez com o que, ao longo da nossa evolução, defesas antioxidantes fossem desenvolvidas. Durante a produção de ATP, processo indispensável para a nossa sobrevivência, mecanismos como a redução de elétron do oxigênio molecular, fazem com que o O_2^- seja produzido frequentemente e fisiologicamente durante a respiração celular na mitocôndria, classificando-a como uma fonte eminente de produção de ROS. Por assim dizer, a mitocôndria possui uma enzima específica, a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), que converte O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) onde na presença de ferro forma uma espécie altamente reativa, o radical hidroxila (OH^\bullet) (Green et al., 2004). Além disso, sabe-se que no retículo sarcoplasmático (RS) cardíaco e do músculo esquelético há presença das enzimas NAD(P)H oxidases, que é fonte de geração de O_2^- . A produção de O_2^- derivada destas enzimas parece influenciar na liberação de cálcio no RS via oxidação do receptor de rianodina (Powers and Jackson, 2008).

Já está bem estabelecido que o exercício físico agudo prolongado e de alta intensidade aumenta a produção de ROS além de RNS, contribuindo assim para o estado do balanço redox muscular. Contudo, há pesquisadores sugerindo que, o estresse oxidativo induzido pelo exercício crônico é interessante, uma vez que tal indução favorecerá a adaptação das defesas antioxidantes (Nojima et al., 2008; Syu et al., 2011). Este efeito adaptativo se torna de extrema importância, uma vez que a produção exacerbada de agentes oxidantes causa um desbalanço no estado redox, e consequentemente sérios danos às células, DNA e tecidos, inclusive o tecido muscular.

A escassez de trabalhos que objetivam avaliar o efeito da suplementação com nitrato sobre parâmetros de estresse oxidativo parece ser o atual cenário. Entretanto, um estudo teve como objetivo testar o possível efeito terapêutico da suplementação com nitrato em modelo de doença renal e cardiovascular ao avaliar marcadores de estresse oxidativo. Os autores encontraram que tal suplementação na concentração de 0.1 ou 1 mmol.Kg⁻¹.dia⁻¹ foi capaz de reduzir os níveis de malondialdeído, de VI F2-isoprostanos (iPF2α-VI) e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) no plasma e na urina, sugerindo o efeito protetor do NO sobre tais doenças (Carlström et al., 2011).

Desta forma, vê-se a necessidade de maior exploração do tema a fim de elucidar os possíveis efeitos do nitrato sobre os marcadores de estresse oxidativo, uma vez que tais marcadores possuem um importante papel no desenvolvimento de algumas doenças e também no que diz respeito a parâmetros que envolvam alterações causadas pelo exercício.

Referências

1. Andrew, P.J. and Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, 43 (1999) 521–531.
2. Bailey, S.J. et al. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **J Appl Physiol** 109: 135–148, 2010.
3. Berry, M. J. et al. Dietary nitrate supplementation improves exercise performance and decreases blood pressure in COPD patients. **Nitric Oxide**, Oct 2014. ISSN 1089-8611. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445634> >.
4. Bescós, R. et al. Sodium nitrate supplementation does not enhance performance of endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 44, n. 12, p. 2400-9, Dec 2012. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182687e5c> >.
5. Bescós, R.; Rodriguez, F.A.; Iglesias, X.; Ferrer, M.D.; Iborra, E.; Pons, A. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO_{2peak} in endurance athletes. **Med Sci Sports Exerc**. 2011;43(10):1979–86.
6. Bond, V. et al. Effects of Dietary Nitrates on Systemic and Cerebrovascular Hemodynamics. **Cardiology Research and Practice**, v. 2013, 2013/12/25 2013. ISSN 2090-8016. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/crp/2013/435629/> >.
7. Butler, A. R.; Flitney, F. W.; Williams, D. L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. In: (Ed.). **Trends Pharmacol Sci. England**, v.16, 1995. p.18-22. ISBN 0165-6147 (Print) 0165-6147.

8. Carlström, M. et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovascular Research** (2011) 89, 574–585.
9. Carreira, B.P. et al. Nitric Oxide Regulates Neurogenesis in the Hippocampus following Seizures. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Volume 2015, Article ID 451512, 14 pages.
10. Deanfield, J. E.; Halcox, J. P.; Rabelink, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.115, 2007. p.1285-95. ISBN 1524-4539 (Electronic)0009-7322 (Linking).
11. Derbyshire, E. R.; Marletta, M. A. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. **Handb Exp Pharmacol**, n. 191, p. 17-31, 2009. ISSN 0171-2004 (Print)0171-2004 (Linking). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_2>.
12. Diaz, M.M.; Bocanegra, O.L.; Teixeira, R.R.; Soares, S.S.; Espindola, F.S. Salivary Nitric Oxide and Alpha-Amylase as Indexes of Training Intensity and Load. **Int J Sports Med** 2013; 34: 8–13.
13. Ding, H., Aljofan, M. and Triggle, C. R. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 212, no. 3, pp. 682–689, 2007.
14. Dinh, Q. N. et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 406960, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2014/406960> >.
15. Evora, P. R. et al. Cardiovascular therapeutics targets on the NO-sGC-cGMP signaling pathway: a critical overview. In: (Ed.). **Curr Drug Targets**. Netherlands, v.13, 2012. p.1207-14. ISBN 1873-5592 (Electronic)1389-4501 (Linking).

16. Forstermann, U.; Munzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. In: (Ed.). **Circulation**. United States, v.113, 2006. p.1708-14. ISBN 1524-4539 (Electronic)0009-7322 (Linking).
17. Garry, P.S.; Ezra, M.; Rowland, M.J.; Westbrook, J.; Pattinson, K.T.S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment – From bench to bedside. **Experimental Neurology** 263 (2015) 235–243.
18. Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. In: (Ed.). **Eur J Neurosci**. France, v.27, 2008. p.2783-802. ISBN 1460-9568 (Electronic)0953-816X (Linking).
19. Green, K., Brand, M.D. and Murphy, M.P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, Vol. 53, Supplement 1, February 2004.
20. Hobbs, D.A.; George, T.W. and Lovegrove, J.A. The effects of dietary nitrate on blood pressure and endothelial function: a review of human intervention studies. **Nutrition Research Reviews** (2013), 26, 210–222.
21. Iantorno, M. et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. In: (Ed.). **J Biol Regul Homeost Agents**. Italy, v.28, 2014. p.169-76. ISBN 0393-974X (Print)0393-974X (Linking).
22. Kapil, V. et al. Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans: Role for Nitrite-Derived NO. **Hypertension** 2010;56:274-281.
23. Kumar, D. et al. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. In: (Ed.). **Proc Natl Acad Sci U S A**. United States, v.105, 2008. p.7540-5. ISBN 1091-6490 (Electronic)0027-8424 (Linking).

24. Larsen, F.J.; Weitzberg, E.; Lundberg, J.O.; Ekblom, B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta Physiol** 2007, 191, 59–66.
25. Larsen, F.J.; Weitzberg, E.; Lundberg, J.O.; Ekblom, B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. **Free Radic Biol Med.** 2010; 48:342–7.
26. Lay, S.L.; Simard, G.; Martinez, M.C.; Andriantsitohaina, R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Volume 2014, Article ID 908539, 18 pages.
27. Lee, T. J. Nitric oxide and the cerebral vascular function. In: (Ed.). **J Biomed Sci.** Switzerland: 2000 National Science Council, ROC and S. Karger AG, Basel, v.7, 2000. p.16-26. ISBN 1021-7770 (Print) 021-7770 (Linking).
28. Li, H.; Horke, S.; Förstermann, U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. **Atherosclerosis** (2014). Nov; 237(1):208-19.
29. Lundberg, J.O. and Govoni, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 37, No. 3, pp. 395 – 400, 2004.
30. Lundberg, J.O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov** 7: 156–167, 2008.
31. Lundberg, J.O. and Weitzberg, E. NO-synthase independent NO generation in mammals. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 396 (2010) 39–45
32. Maeda, S. et al. Moderate Regular Exercise Increases Basal Production of Nitric Oxide in Elderly Women. **Hypertens Res** Vol. 27, No. 12 (2004).

33. Moncada, S.; Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199312303292706> >.
34. Nojima, H. et al. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental** 57 (2008) 170–176.
35. Powers, S.K. and Jackson, M.J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. **Physiol Rev.** 2008 October ; 88(4): 1243–1276.
36. Presley, T. D. et al. Acute effect of a high nitrate diet on brain perfusion in older adults. In: (Ed.). **Nitric Oxide**. United States: A 2010 Elsevier Inc, v.24, 2011. p.34-42. ISBN 1089-8611 (Electronic)1089-8603 (Linking).
37. Punyadeera, C. Saliva: An Alternative Biological Fluid for Clinical Applications. **Journal of Dento-Medical Science and Research**, Vol.1/Jan-June 2013.
38. Santana, H.A.P. et al. Exercise intensity modulates nitric oxide and blood pressure responses in hypertensive older women. **Aging Clin Exp Res** (2013) 25:43–48.
39. Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. **Cell**, 148(3), 399–408.
40. Sharma, A.; Bernatchez, P.N.; De Haan, J.B. Targeting Endothelial Dysfunction in Vascular Complications Associated with Diabetes. **Int J Vasc Med**. 2012; Volume 2012, Article ID 750126, 12 pages.
41. Stamler, J. S.; Meissner, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 209-237, Jan 2001. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333.

42. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. In: (Ed.). **Biochim Biophys Acta**. Netherlands, v.1411, 1999. p.217-30. ISBN 0006-3002 (Print)0006-3002.
43. Syu, G-D.; Chen, H-i.; Jen, C.J. (2011). Severe Exercise and Exercise Training Exert Opposite Effects on Human Neutrophil Apoptosis via Altering the Redox Status. **PLoS ONE** 6(9): e24385.
44. Totzeck, M. et al. Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. In: (Ed.). **Nitric Oxide**. United States: 2012 Elsevier Inc, v.27, 2012. p.75-81. ISBN 1089-8611 (Electronic)1089-8603 (Linking).
45. Umbrello, M. et al. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 14, p. 1690-710, Nov 10 2013. ISSN 1557-7716 (Electronic)1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4979> >.
46. Vanhatalo, A. et al. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 299: R1121–R1131, 2010.
47. Webb, A. J. et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. In: (Ed.). **Hypertension**. United States, v.51, 2008. p.784-90. ISBN 1524-4563 (Electronic)0194-911X (Linking).
48. Wilkerson, D.P. et al. Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. **Eur J Appl Physiol** (2012) 112:4127–4134.

49. Wink, DA et al. Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide. **Antioxidants & Redox Signaling**. Volume 3, Number 2, 2001.

50. Yassin, L. et al. Nitric oxide signaling modulates synaptic inhibition in the superior paraolivary nucleus (SPN) via cGMP-dependent suppression of KCC2. **Front Neural Circuits**, v. 8, p. 65, 2014. ISSN 1662-5110 (Electronic)1662-5110 (Linking). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2014.00065> >.

Capítulo 2

Effects of sodium nitrate supplementation on exercise intensity and oxidative stress markers and hemodynamic variables in physically active male subjects.

(Formato segundo as normas da revista **International Journal of Sports Medicine**)

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos da suplementação com nitrato sobre marcadores de intensidade de exercício e de estresse oxidativo, e variáveis hemodinâmicas em homens fisicamente ativos. Quatorze sujeitos foram submetidos a quatro testes com um intervalo de cinco dias entre eles. A suplementação com nitrato (grupo NO) e placebo (grupo PL) foi aguda (AC) e durante os cinco dias seguintes (FD). A saliva foi coletada no basal (0'), sessenta minutos após a suplementação (60'), imediatamente após o teste (90'), quinze, trinta e sessenta minutos após o teste (105', 120 'e 150'). O grupo NO teve maiores concentrações de nitrito em ambos os tratamentos, quando comparados com o grupo PL. Além disso, a área abaixo da curva mostra que o grupo NO teve o perfil das concentrações de ácido úrico e FRAP superior e o perfil da pressão arterial sistólica inferior no FD. No entanto, não houve diferença entre os biomarcadores intensidade de exercício. Os resultados sugerem que a suplementação com nitrato agiu indiretamente como um antioxidante e modulou a pressão arterial sistólica, características positivas para a saúde vascular.

Palavras-chave: Suplementação com nitrato; óxido nítrico; estresse oxidativo; pressão arterial; Saliva; Exercício.

Abstract

This study evaluated the nitrate supplementation effects on exercise intensity and oxidative stress markers and hemodynamic variables in physically active male subjects. Fourteen subjects were submitted to four tests with an interval of five days between them. The nitrate (NO group) and placebo supplementation (PL group) were acute (AC) and during the following five days (FD). Saliva was collected at basal (0'), sixty minutes after supplementation (60'), immediately after exercise (90'), fifteen, thirty and sixty minutes after test (105', 120' and 150'). NO group had higher concentrations of nitrite in both treatments when compared with PL group. Furthermore, the area under the curve of NO group shows that the uric acid and FRAP concentrations had a higher profile and a lower systolic blood pressure profile in FD. However, there was no difference between the exercise intensity biomarkers. The results suggest that nitrate supplementation indirectly acted as an antioxidant and modulated the systolic blood pressure, positive characteristics for vascular health.

Keywords: Nitrate supplementation; nitric oxide; oxidative stress; Blood Pressure; Saliva; Exercise.

Introduction

Studies have shown an increase in the use of nitrate supplementation and its possible effects on many human's systems. Nitrate when derived from diet may be reduced to nitric oxide through nitrate-nitrite-NO reductor system. Furthermore, the NO synthesis, maybe achieved endogenously/enzymatically by reduction of L-arginine to L-citrulline, controlled by three different isoforms of nitric oxide synthase (NOS) (Stuehr, 1999), which are: endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS).

The endothelium plays a critical role in the regulation of vascular health, which is responsible for the release of some vasoactive mediators, such as nitric oxide, prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor, that act on relaxation of the vascular wall (Félétou and Vanhoutte, 2006). Furthermore the factors above mentioned, to maintain vascular function, the endothelium controls the balance of anti-inflammation and proinflammation, antioxidation and prooxidation, antithrombosis and prothrombosis. On the other hand, endothelial dysfunction could be due to decreased eNOS expression and many others molecular defects that could be responsible for reductions in endothelium-dependent vascular relaxation (Forstermann and Munzel, 2006). Perhaps, it could explain the association between endothelial dysfunction and the presence of cardiovascular risk factors.

Despite nitrate and nitrite are biological precursors of NO, which may result in an increase of its bioavailability (Sidler et al., 2014), nitrate supplementation has been used as a strategy to increase the nitrite concentration (Vanhatalo et al., 2011), which may also increases the NO concentration. Some predictions have already been found depending on the NO level. According to Rassaf et al. (2007), high levels of plasma NO during exercise may predict the aerobic capacity in trained men. However, low concentrations of NO have been found in subjects with hypertension and type II diabetes, suggesting that alterations in the NO pathway have negative healthy impacts, which may lead to diabetes and hypertension (Ayub et al., 2011).

Oxidative stress, characterized as an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the ability of biological systems to combat reactive intermediates (Lay et al., 2014), also seems to play a role in the development of some diseases. The endothelial dysfunction, which is a particular feature found in cardiovascular diseases, may be affected by the increase of ROS production or by the reduction of NO production (Higash et al., 2013). However, there is a dual-effect involving NO and the oxidative system, upon which NO can act both as an oxidizing and antioxidant agent. In the first case, the superoxide radical can bind to NO, producing a potential oxidant known as peroxynitrite (Wink et al., 2001). NO exerts its antioxidant property by eliminating oxidants produced in the Fenton reaction and reducing equivalents provided by superoxide (O_2^-), or also preventing the reaction of peroxide (Wink et al., 2001).

Considering the impact caused by oxidative stress on the endothelium via NO bioavailability reduction (Touyz, 2004), our hypothesis is that nitrate supplementation will: 1) increase nitrite concentrations, thus inferring the concentration of NO; 2) act as a possible antioxidant; 3) modulate blood pressure; and 4) improve the levels of exercise intensity biomarkers.

Methods

Subjects

Subjects were recruited from Federal University of Uberlandia and from some gym of the city. Subjects were 14 male (age 22.07 ± 3.29 years), physically active, non smokers and that took no kind of supplementation. The incremental test was performed to evaluate the maximal load and then to prescribe the main tests load. The experimental protocol was approved by the Institutional Review Board.

Design

In total, there were five visits. The first one was carried out an assessment of body composition by bioelectrical impedance (BIA balance-pole, Tanita BC558), familiarization with the cycle ergometer (Bike Mechanics Braking, CEFISE, Campinas, SP) and realization of the incremental test to prescribe the subsequent tests load. The four following visits were to the achievement of physical tests, performed under the same conditions with controlled temperature (22 ° C), always in the morning (8:00 to 12:00). For the tests, the volunteers were instructed to abstain from any kind of physical activity for a period of 24 hours, but they were allowed to keep their training routine during the week. They were also instructed to maintain the usual diet and asked to elaborate a reminiscent diet from last 24 hours. Each test was repeated after five days. At the end of the second test, there was a washout period with seven days and return to conduct two identical further tests. Supplementation followed the same model, with the volunteer ingesting one capsule per day (Figure 1). A low diet rich in foods containing nitrate (green vegetables, beets, strawberry, grape and tea) was recommended 24 hours prior to tests. Furthermore, the subjects were asked to avoid the consumption of alcohol, caffeine-based products and other stimulants for the same period.

Supplementation

Participants were randomly assigned in a double-blind crossover study, received a dose of sodium nitrate (NO group, 10 mg. Kg⁻¹ body weight) or placebo (sodium chloride, PL group) contained in capsules. Both capsules were indistinguishable in appearance. On the first day (AC), individuals took the capsule after the baseline collects (one hour before the test) and were instructed to take them every day in the morning (an hour after breakfast). On the fifth day (FD), the intake happened in the same way as the first day. The volunteers had a washout period of seven days, when no supplementation was

taken. The following week, they returned to the lab for another five identical days, but getting the other supplement.

Incremental Test

The incremental test until voluntary exhaustion was applied to specify the physical tests load. This test consists in increments of 35 watts every two minutes and a fixed rotation of 70 rpm. The criteria for test completion followed the recommendations of the American College of Sports Medicine (Garber et. al., 2011). The maximum power reached in the test was calculated from the following formula according to Stegmann et. al.,1981.

Main Tests

Later tests consisted in thirty minutes with 50% of maximum load maintaining 70 rpm. In all tests, the heart rate (HR) was monitored through a frequency counter (Polar RS800CX) and the blood pressure (BP) by a pressure gauge (OMRON HEM 7200). The points of these samples were: basal (0'), one hour after the supplement (60'), immediately after the test (90 ') and 15 (105'), 30 (120 '), 45 (135') and 60 (150 ') minutes after the test.

Saliva sampling and handling

Saliva was collected in collection vials with no exogenous stimulation using the guidelines proposed by Granger et al., (2007). Subjects were instructed to accumulate saliva naturally without extreme movements of the oral region. Each subject received a 15 mL collection tube where the spit was deposited for one minute. Then, the samples were placed on ice and transported to the laboratory to be centrifuged. The supernatant was aliquoted and stored at -80°C.

Determination of [NO]

Nitric oxide content was determined by measuring the formation of nitrite using the Griess reaction (Granger, 1996). Equal volumes of saliva and Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% phosphoric acid) were incubated at room temperature for 10 minutes. Absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader, in duplicate. The content of nitrite was calculated based on a standard curve constructed using sodium nitrite (NaNO_2).

Salivary total protein concentration and protein profile

The concentration of total protein in each sample was determined using the Bradford method, according to a standard curve constructed using bovine serum albumin (BSA) (Bradford, 1976). Absorbance was measured at 595 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) and all samples were assayed in duplicate.

Salivary alpha-amylase concentration

To avoid possible effects of salivary flow rate on the concentration of proteins, 10 μg of total protein from each sample was loaded onto 5–22% denatured SDS–PAGE. Proteins were separated and transferred onto nitrocellulose membranes for 2 hours at 100 mA at 4°C. Membranes were blocked for 4 hours at 4°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk in PBS w/v) and incubated overnight at 4°C with a homemade affinity purified polyclonal rabbit anti-human sAA antibody (dilution 1:5000). Membranes were subsequently incubated with secondary antibodies for 3 hours, and alpha-amylase was detected using ECL reagents. Densitometric analyses of the spots were performed using ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The area of the pixels from each spot was determined in triplicate and the mean values were used for statistical analyses.

Salivary lactate concentration

Salivary lactate was analyzed by an electroenzymatic method using a biochemical analyzer YSI 2300 STAT plus (Yellow Springs, Ohio, USA). A volume of 25 μ L was used for the determination of salivary lactate concentration. The samples were analyzed in duplicate.

Salivary uric acid concentration

Salivary uric acid concentrations were measured with a kit supplied by Labtest (Brazil), according to the manufacturers' instructions. Uricase is used in the assay to transform uric acid into allantoin and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide in the presence of peroxidase reacts with 4-aminoantipyrine and DHBS, forming the chromogenantipirilquinonimine that is read at 505 nm; the samples were analyzed in duplicate.

Salivary total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity was evaluated by assessing the reduction of iron in its ferric state (Fe^{3+}) to its ferrous state (Fe^{2+}) at low pH (Benzie and Strain, 1999). This process forms an intense blue color complex, iron-tripiridiltriazina (TPTZ), which was analyzed spectrophotometrically at 593 nm, in duplicate. Total antioxidant capacity was calculated based on a standard curve constructed using 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox).

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assayed by measuring TBAR products by the method of Walls et al. (1976), adapted to microplate. Trichloroacetic acid 50% (w/v) was added to saliva supernatant, followed by incubation and centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Then, the supernatant was removed and was added 0.75% thiobarbituric acid 0.75% in 0.1 M-HCl. The samples were heated at 90-

95°C for 20 min and centrifuged for 10 min. The supernatant was removed and the pink chromophore was assayed spectrophotometrically at 532 nm, in duplicate. The standard curve was prepared with malonaldehydebis (dimethylacetal) hydrolysed with 6M-HCl.

Salivary superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated kinetically according to the inhibition of the reaction of superoxide radical with pyrogallol (Marklund, 1985). SOD activity was determined by measuring the oxidized pyrogallol formation rate, spectrophotometrically at 420 nm every 15 seconds for 10 min, in duplicate.

Statistic Analyses

Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test prior to analyses. No transformations were necessary for any of the variables. The concentration of all analytes at each sampling time was averaged and compared between groups using One-Way ANOVA followed by Tukey as post-test for parametric values, and Kruskal-Wallis followed by Dunn's as post-test for nonparametric values. The area under the curve (AUC) was used as temporal analysis of the variables. For all analyses, significance level was $p = 0.05$. Results are shown as means \pm SEM.

Results

Subject's habitual physical activity program and dietary intake was similar during all experiment period. As expected, none side effects were reported. Baseline characteristics and maximal load of subjects are given in Table 1.

Table 1 - Baseline characteristics and maximal load. Data are mean \pm SEM.

Age	22.07 \pm 0.88
Body weight	69.36 \pm 3.00
Fat mass	14.82 \pm 1.53
Lean mass	56.88 \pm 1.52
BMI (Kg/m ²)	22.93 \pm 0.94
Maximal load (watts)	243.6 \pm 0.11

Salivary [NO₂⁻]

The mean values of salivary [NO₂⁻] are shown in Figure 2. The individuals who were supplemented with sodium nitrite capsule containing 10 mg/Kg of body weight had an increase of salivary nitrite concentration both in AC and FD, compared to placebo group (Fig. 2A and 2B). Furthermore, the area under curve of NO group was significantly higher than the PL group, both in AC and FD (Fig. 2C and 2D).

Heart Rate

The figure 3 shows that the two groups had the same FC profile in both treatments. As expected, there was a significant difference only at post-test (Fig. 3A and B).

Systolic and Diastolic Blood Pressure

The results of systolic and diastolic blood pressure are presented in Figure 4. The acute treatment did not cause changes in systolic or diastolic blood pressure between the treatments (Figure 4A; B; C and D). However, in

FD (Figure 4E; F; G and H), the systolic blood pressure of NO group was lower over time when compared to PL group, as observed by area under curve presented in Figure 4F.

Exercise Intensity Biomarkers

Salivary Lactate, alpha-amylase and Total Protein (TP)

There was no difference in salivary lactate concentration in both groups at different treatments (5A, 5B, 5C, 5D). The mean values of salivary total protein concentration were shown in Figure 6. Although has occurred an increase in total protein levels at all points in relation to baseline, there was no significant difference intra/inter groups (Fig 6A, B, C and D). In the same way, the salivary alpha-amylase concentration was not affected by the treatments, as shown in Figure 7.

Oxidative Stress Markers

Salivary [Uric Acid], Total antioxidant capacity, Lipid Peroxidation and SOD

The mean values of salivary uric acid concentration are presented in Figure 8. Although there was no difference between the points collection of supplementation, the concentration of uric acid in DF was higher over time in NO group than in the PL group, but not in AC treatment (Figure 8A and 8C). Thus, in relation to FD, the area under curve in NO group was significantly higher (Fig. 8D), a result that was not found in AC (Figure 8B). Furthermore, the NO group submitted to FD treatment showed higher basal uric acid concentration than the AC treatment (Figure 8E); however, this was not seen for PL group (Figure 8F).

Figure 9 shows that while there was no difference in salivary total antioxidant capacity intra/inter groups (Figure 9C), the area under curve in FD

was higher in NO group than the PL group (Figure 9D). This result was not observed for AC (Figure 9A and 9B).

As shown in Figure 10, there was no difference in lipid peroxidation between the groups and treatments (Figure 10A, 10B, 10C and 10D). Likewise, SOD activity has not changed inter/intra groups (Figure 11A, 11B, 11C and 11D). Apparently, the basal SOD activity seems to be increased in both of the groups submitted to FD treatment, but no significance was observed (data not shown).

Discussion

The main result of the present study was that five days of sodium nitrate supplementation increased basal salivary concentration of uric acid, increased total antioxidant activity during the test and modulated systolic blood pressure, suggesting prolonged sodium nitrate supplementation as an antioxidant agent which also exerts a positive effect on vascular health. Furthermore, both AC and FD treatments were able to increase salivary nitrite concentration during all tests. In regard to exercise intensity biomarkers, acute or prolonged nitrate supplementation was not able to alter them. Another result was observed: the exercise was not able to induce oxidative stress. This finding is supported by the findings of Viña and colleagues (2000), claiming that oxidative stress occurs only in exhaustive exercise. It makes sense when we analyze lactate levels found in this study.

Uric acid is considered one of the most important natural antioxidant agents in humans, which has distinct roles in various pathological conditions. Being considered as final product of catabolism of purines, its production is through the enzyme xanthine oxidase, which uses molecular oxygen as electron acceptor for such reaction. Supporting one of our hypotheses, after five days of supplementation the NO group showed a higher concentration profile of this acid when compared to the placebo group. Furthermore, the basal uric acid concentration increased significantly in FD treatment's NO group when compared with AC in the same group. This increase can be explained from the

results found in the work of Squadrito and colleagues (2000). According to these authors, peroxynitrite generated in the reaction of NO with superoxide can react with CO_2 generating reactive intermediates ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}_2$) which can be removed directly by uric acid. Thus, uric acid would be exercising its function as an antioxidant agent. Future studies become necessary to investigate deeper this mechanism in healthy subjects. However, taking into consideration the correlation of plasma concentration of uric acid and salivary (Deminice et al, 2010; Kondakova et al, 1999), this acid level achieved in the present study did not feature a hyperuricemia status.

The total antioxidant capacity reflects the ability which an organism has to keep a balance between oxidants and antioxidants or even repair the damage caused when the production of oxidants is found in greater proportions. However, the increase in uric acid concentrations in FD found only in the NO group seems to have been accompanied by an increase in total antioxidant capacity behavior. The FRAP method consists of the ferric reducing ability of a biological fluid when, at low pH, the ferritripiridiltriazina complex (FeIII-TPTZ) is reduced to the ferrous form (FeII) (Benzie and Strain, 1996). These results are combined when taking into account the estimated components that contribute to the FRAP values, which it is known that uric acid is about 60% of the total antioxidant capacity (Benzie and Strain, 1996).

However, even finding no differences in lipid peroxidation nor in SOD activity, the results seem to favor an indirect antioxidant effect by the nitrate supplementation. Our hypothesis that peroxynitrite is formed by the reaction between superoxide and NO, would be accompanied of the increase in uric acid concentrations in order to eliminate the free radicals so formed. Although it was a different mechanism to the one found in this study, an antioxidant effect was found by Carlström et al. (2011) to supplement with nitrate rats with induced hypertension. Thus, future studies are needed to investigate levels of superoxide and peroxynitrite formation in such conditions, which could give support to this hypothesis and also check deeper into mechanisms by which NO act as antioxidant in humans.

Lipid peroxidation is considered a consequence of excess of reactive species production, and is used as a parameter for determining the level of

oxidative stress. The nitrate supplementation did not change this parameter, suggesting that, for the concentration of nitrite found as a result of supplementation, a pro-oxidative character compromising the level was not evidenced. In addition to other sources of oxidative stress when are overproduced, lipid peroxidation has a relevant role in the development of several diseases, including neurodegenerative diseases (Pisoschi and Pop, 2015).

Confirming one more of our hypotheses, NO group had higher nitrite concentrations compared to placebo in both treatments. Our results confirm those which show that the nitrate supplementation, organic or inorganic, has been reported to increase the plasma concentrations so as salivary nitrite (Larsen et al., 2014). It is well accepted that the nitrate and nitrite are no longer considered just finishing products of NO synthesis via L-arginine, but also those who initiate such a synthesis. In the oral cavity, facultative anaerobic bacteria uses nitrate as a final electron acceptor, reducing it to nitrite. At the stomach acid environment, nitrite may be reduced to NO (Omar et al., 2012). As such, the process reducing nitrate-nitrite-NO may be an explanation for the increase in nitrite concentration, then NO, suggesting increased consumption of nitrate-rich foods and its supplementation as possible strategies to achieve higher levels of NO.

Among the various properties of NO in our organism, the one referred to vascular health was part of the objectives of this study. Although a difference in basal blood pressure has not been found, the systolic blood pressure in the FD of NO group showed a higher reduction profile compared to placebo group. This blood pressure lowering effect can be derived from the NO synthesis (Kelm, 1999), which important role in vascular health is already well accepted. NO causes vascular relaxation through mechanisms that are dependent on cGMP levels, activation of protein kinase pathway, leading to less phosphorylation of myosin; or via calcium-sensitive potassium and ATP-sensitive channels (Umbrello et al., 2013). Studies have demonstrated that diseases such as hypertension and diabetes are correlated with the levels of NO (Hobbs et al, 2013; Ayub et al, 2011), and in addition, such levels can predict aerobic capacity in trained men (Rassaf et al., 2007). Regarding the results of baseline BP, we believe that, due to the fact of the volunteers are young and healthy, the

concentration of NO released in these conditions is enough to maintain the balance of vascular function.

Our results showed that sodium nitrate supplementation failed to reduce any exercise intensity biomarker, going against our last hypotheses. Studies have shown that nitrate supplementation improves exercise capacity in human through mechanisms such as reducing the cost of O₂ during exercise, improvement of muscle contractility and reduced muscle disorder (Berry et al., 2014; Breese et al., 2013; Cermak et al., 2012; Lansley et al., 2011; Vanhatalo et al., 2011). Although the assessment of exercise capacity was not one of our goals, our hypothesis was that, along with improved ability to perform an exercise, the nitrate supplementation could also reduce the concentrations of exercise intensity biomarkers. In regard to these markers, our results are supported, for example, by those that found no difference between plasma lactate concentration after nitrate supplementation (Larsen et al., 2007).

According to the results found in this study, we conclude that acute sodium nitrate supplementation did not alter any parameters. However, prolonged nitrate supplementation provided an indirect antioxidant effect and modulated the systolic blood pressure profile in healthy and physically active subjects, stressing an important role of NO for vascular health.

References

1. Ayub SG; Ayub T; Khan SN; Dar R; Andrabi KI. Reduced nitrate level in individuals with hypertension and diabetes. **J Cardiovasc Dis Res** 2011;2:172-6.
2. Benzie IF and Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27. 1999.
3. Berry MJ et al. Dietary nitrate supplementation improves exercise performance and decreases blood pressure in COPD patients. **Nitric Oxide**. 2014 Oct 27. pii: S1089-8603(14)00465-0.
4. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal Biochem** 72:248–254.
5. Breese BC, McNarry MA, Marwood S, Blackwell JR, Bailey SJ, Jones AM. Beetroot juice supplementation speeds O₂ uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 305 (2013) R1441–R1450.
6. Carlström, M. et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovascular Research** (2011) 89, 574–585.
7. Cermak NM; Gibala MJ; van Loon LJC. Nitrate Supplementation's Improvement of 10-km Time-Trial Performance in Trained Cyclists. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 2012, 22, 64 -71.

8. Deminice R; Sicchieri T; Payao PO; Jordao AA. Blood and Salivary Oxidative Stress Biomarkers Following an Acute Session of Resistance Exercise in Humans. **Int J Sports Med** 2010; 31: 599 – 603.

9. Félétou, M.; Vanhoutte P.M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. Where Are We Now? **Thromb Vasc Biol.** 2006;26:1215-1225.

10. Forstermann, U.; Munzel, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. In: (Ed.). **Circulation.** United States, v.113, 2006. p.1708-14. ISBN 1524-4539 (Electronic)0009-7322

11. Garber, C.E.; Blissmer, B.; Deschenes, M.R.; Franklin, B.A.; Lamonte, M.J.; Lee, I.M.; Nieman, D.C.; Swain, D.P.; AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 2011 Jul;43(7):1334-59.

12. Granger, D.A.; Kivlighan, K.T.; Fortunato, C. et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. **Physiol Behav** 2007;92(4):583-590.

13. Granger, D.L.; Taintor, R.R.; Boockvar, K.S.; Hibbs, J.B. Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods Enzymol.** 1996;268:142-51.

14. Higashi, Y.; Maruhashi, T.; Noma, K.; Kihara, Y. .Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. **Trends Cardiovasc Med.** 2014 May; 24(4):165-9.

15. Hobbs DA; George TW and Lovegrove JA. The effects of dietary nitrate on blood pressure and endothelial function: a review of human intervention studies. **Nutrition Research Reviews** (2013), 26, 210–222.
16. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. **Biochimica et Biophysica Acta** 1411 (1999) 273-289.
17. Kondakova I, Lissi EA, Pizarro M. Total reactive antioxidant potential in human saliva of smokers and non-smokers . **Biochem Mol Biol Int** 1999; 47: 911 – 920.
18. Lansley KE et al. Acute Dietary Nitrate Supplementation Improves Cycling Time Trial Performance. **Med Sci Sports Exerc.** 2011 Jun;43(6):1125-31.
19. Larsen FJ et al. Dietary nitrate reduces resting metabolic rate: a randomized, crossover study in humans. **Am J Clin Nutr** 2014; 99:843–50.
20. Larsen FJ; Weitzberg E; Lundberg JO; Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta Physiol** 2007, 191, 59–66.
21. Lay, S.L.; Simard, G.; Martinez, M.C.; Andriantsitohaina, R. Oxidative Stress and Metabolic Pathologies: From an Adipocentric Point of View. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Volume 2014, Article ID 908539, 18 pages.
22. Marklund SL (1985). Pyrogallol autooxidation. In RA Greenwald, ed, **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 243–247.
23. Omar SA; Artime E; Webb AJ. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. **Nitric Oxide** 26 (2012) 229–240.
24. Pisoschi AM and Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem.** 2015 Jun 5;97:55-74.

25. Rassaf, T., Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Mangold, S., Leyendecker, T., Kelm, M. (2007). Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. **Br J Sports Med**, 41(10),669-673.
26. Sindler, A.L.; DeVan, A.E.; Fleenor, B.S. and Seals, D.R. Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. **J Appl Physiol** 116: 463–477, 2014.
27. Squadrito GL et al. Reaction of Uric Acid with Peroxynitrite and Implications for the Mechanism of Neuroprotection by Uric Acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics** Vol. 376, No. 2, April 15, pp. 333–337, 2000.
28. Stegmann, H.; Kindermann, W. and Schnabel, A. Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. **Int J Sports Med**. 1981 Aug;2(3):160-5.
29. Stuehr, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. In: (Ed.). **Biochim Biophys Acta**. Netherlands, v.1411, 1999. p.217-30. ISBN 0006-3002 (Print)0006-3002.
30. Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension** 2004 Sep;44(3):248-52.
31. Umbrello M; Dyson A; Feelisch M; Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching (REV 1). **Antioxid Redox Signal**. 2013 Nov 10;19(14):1690-710.
32. Vanhatalo, A. et al. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. **J Physiol** 589.22 (2011) pp 5517–5528.

33. Viña, J et al. Free Radicals in Exhaustive Physical Exercise: Mechanism of Production, and Protection by Antioxidants. **IUBMB Life**. 2000 Oct-Nov;50(4-5):271-7.
34. Walls, R.; Kumar, K.S. & Hochstein, P. Ageing of human erythro-cytes. **Arch. Biochem. Biophys**. 1976, 100, 119–128.
35. Wink, DA et al. Mechanisms of the Antioxidant Effects of Nitric Oxide. **Antioxidants & Redox Signaling**. Volume 3, Number 2, 2001.

Figures and legends

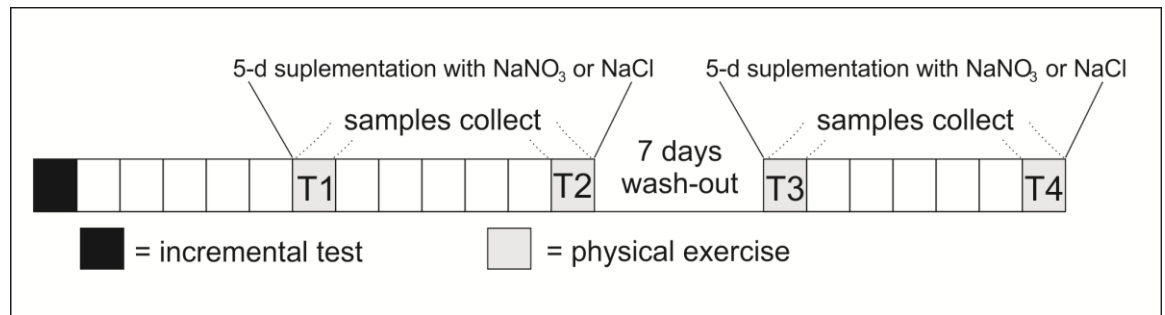


Figure 1. Eschematic representation of the experimental design. Firstly, subjects performed an incremental test (black square). Main tests were performed with an interval of 5 days between them and 7 days of wash-out period was applied between second and third tests (T1, T2, T3 and T4). The supplementation was acute (AC) and during 5 days (FD). Saliva was collected at basal (0'), sixty minutes after supplementation (60'), immediately after exercise (90'), fifteen, thirty and sixty minutes after test (105', 120' and 150').

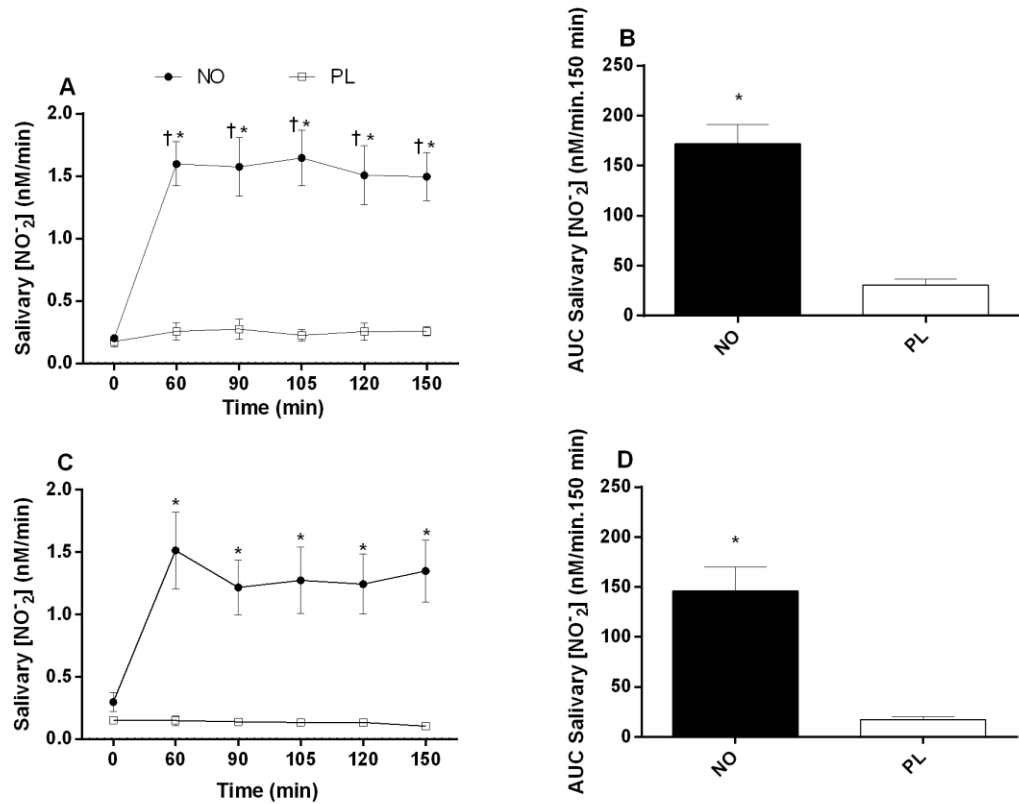


Figure 2 – Salivary $[\text{NO}_2^-]$ after AC (A) and FD (C) treatments of NO (●) and PL groups (□). [†]Difference from baseline group ($P < 0.05$); * Difference from each collecting point of PL group ($P < 0.05$). Area under curve of acute supplementation (B) and after 5 days (D) * Difference from PL group ($P < 0.05$) (means values \pm SEM).

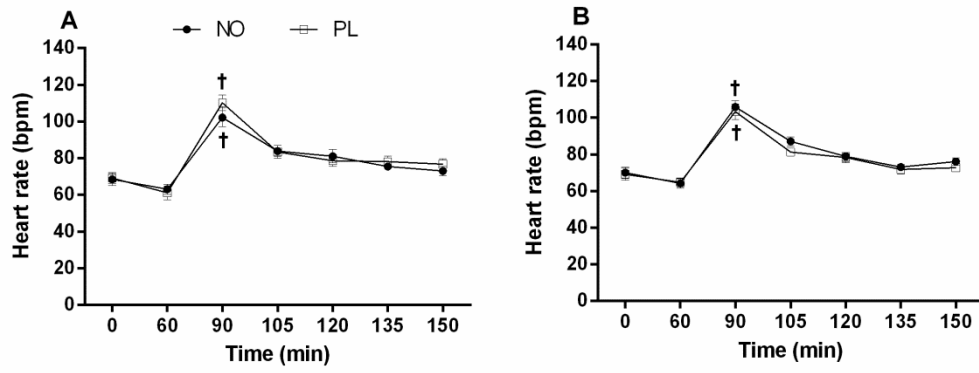


Figure 3 – Heart rate profile during AC (A) and FD treatments (B). [†]Difference from baseline group ($P < 0.05$).

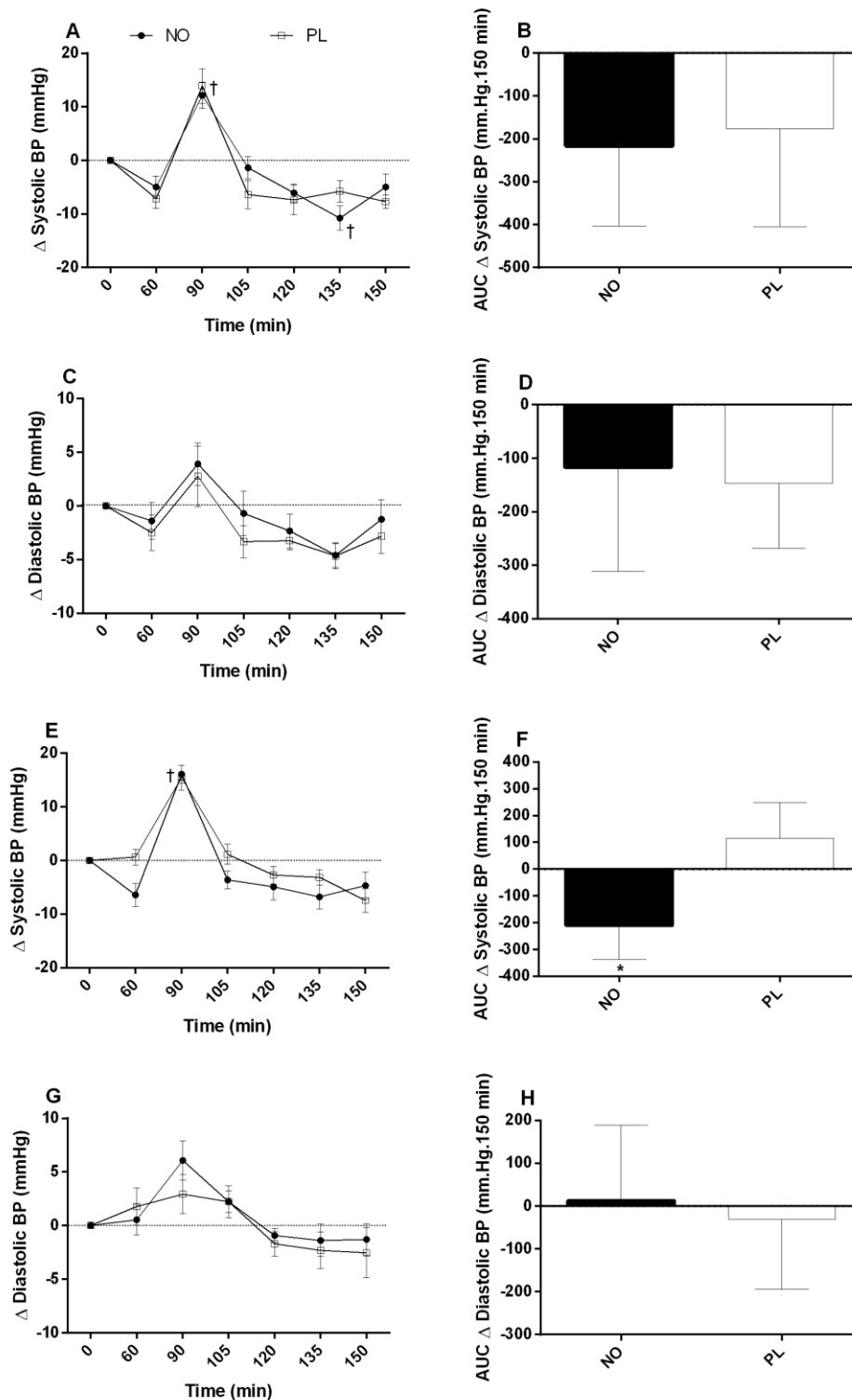


Figure 4 – Change (Δ) relative blood pressure to supplementation baseline in AC and FD treatments. Systolic blood pressure [BP; AC (A) and FD (E) treatments]. Diastolic BP in AC (C) and FD (G) treatments. †Difference from 60' ($P < 0.05$). Systolic BP area under curve in AC (B) and FD (F) treatments. Diastolic BP area under curve in AC (D) and FD (H) treatments (group means \pm SEM). * Difference from PL group ($P < 0.05$).

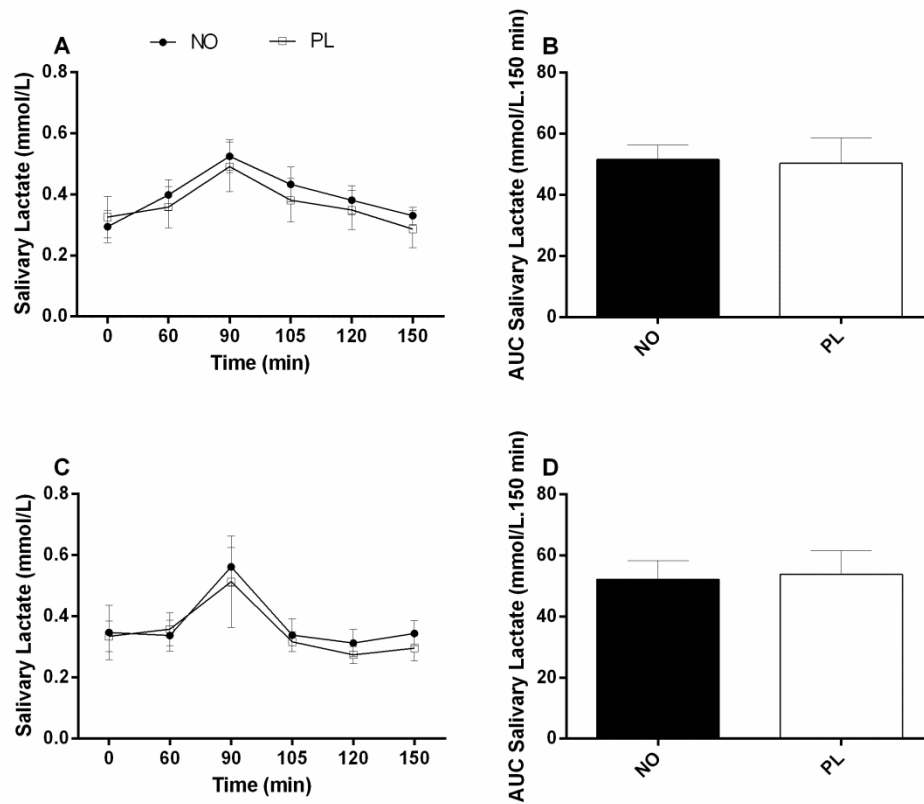


Figure 5 – Salivary lactate concentration during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve of AC (B) and FD (D) treatments.

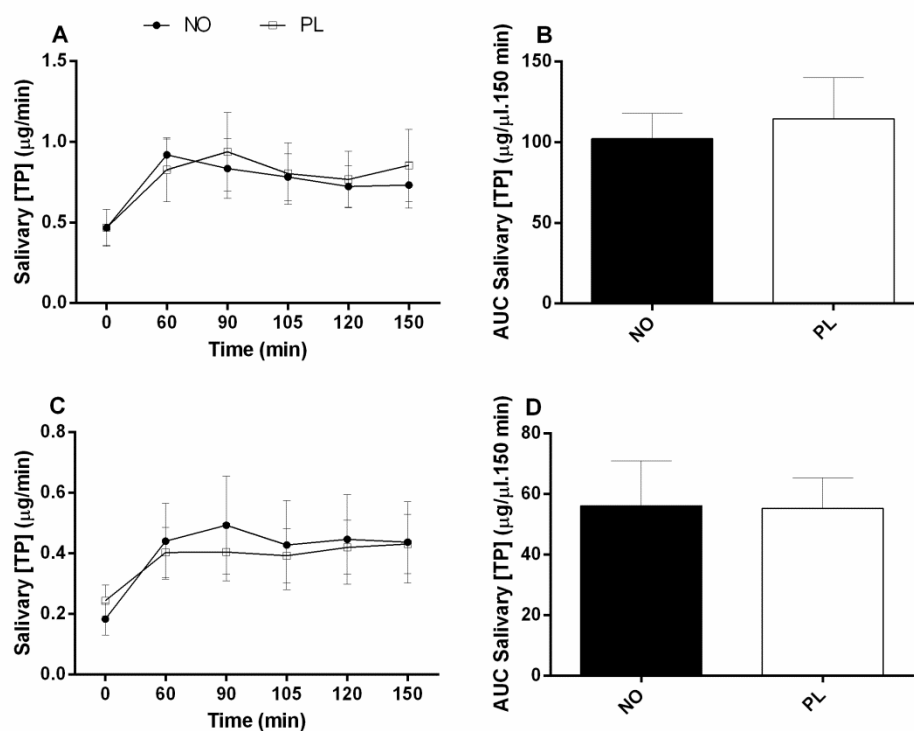


Figure 6 – Salivary TP concentration during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve of AC (B) and FD (D) treatment.

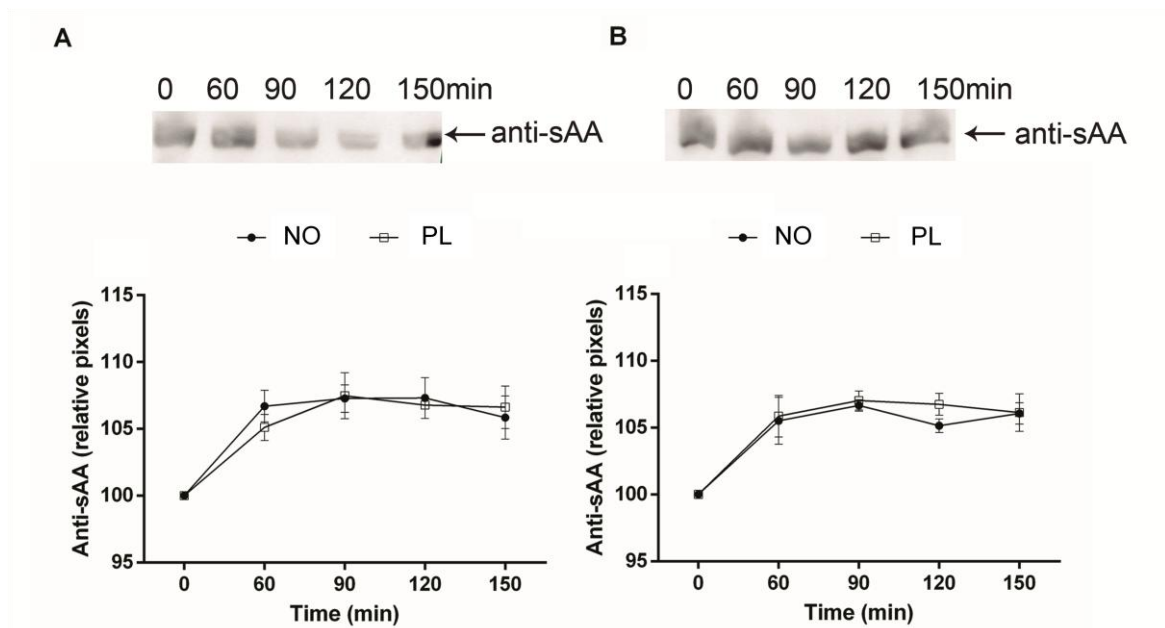


Figure 7 – Alpha-amylase concentration relative pixels during AC (A) and FD (B) treatments.

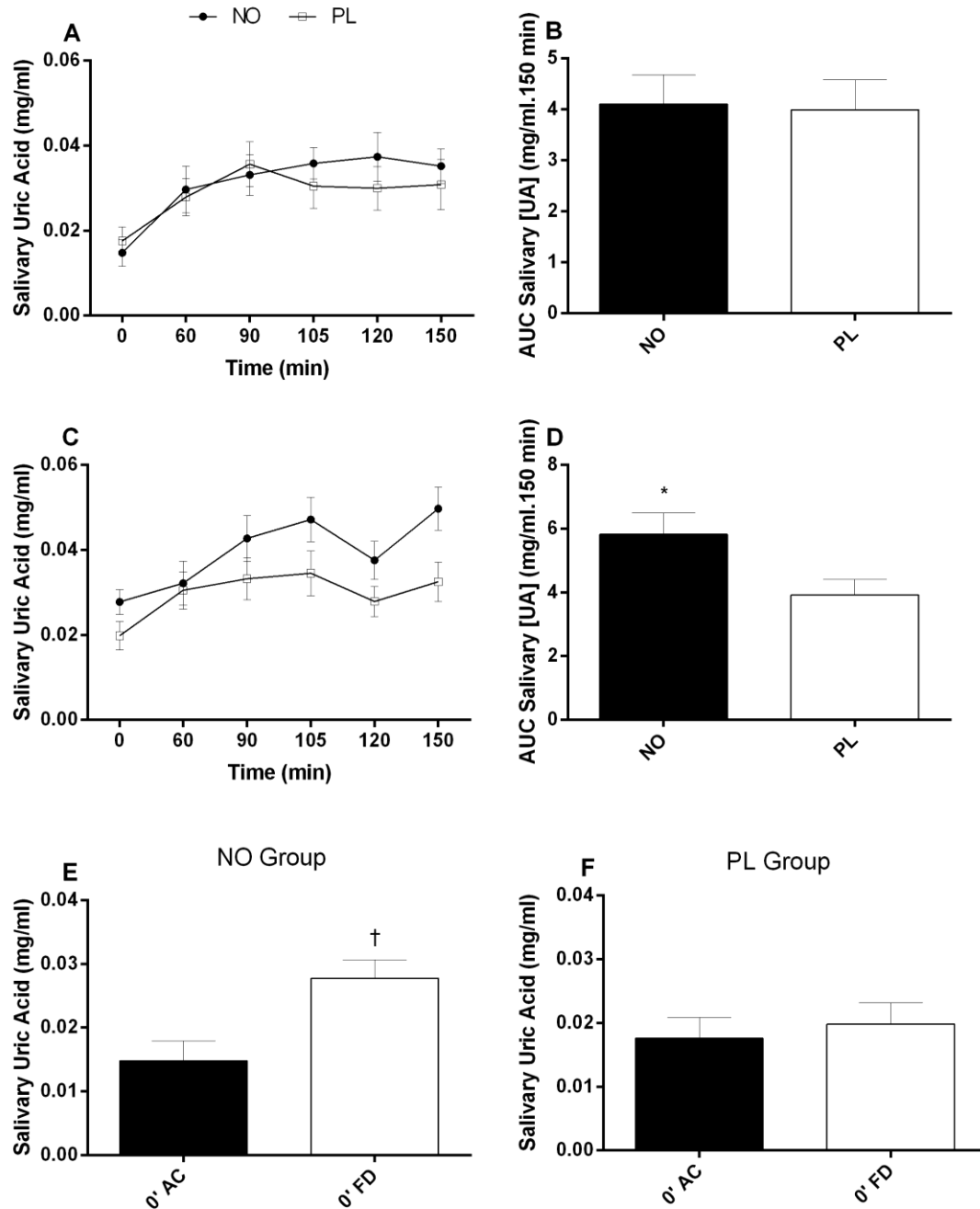


Figure 8 – Salivary Uric Acid concentration during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve in AC (B) and FD (D) treatments. *Difference from PL group. Baseline uric acid concentration between groups (NO group, E; PL group, F); *Difference from treatments ($P < 0.05$). †Difference between AC and FD treatments on basal uric acid concentration ($p < 0.05$).

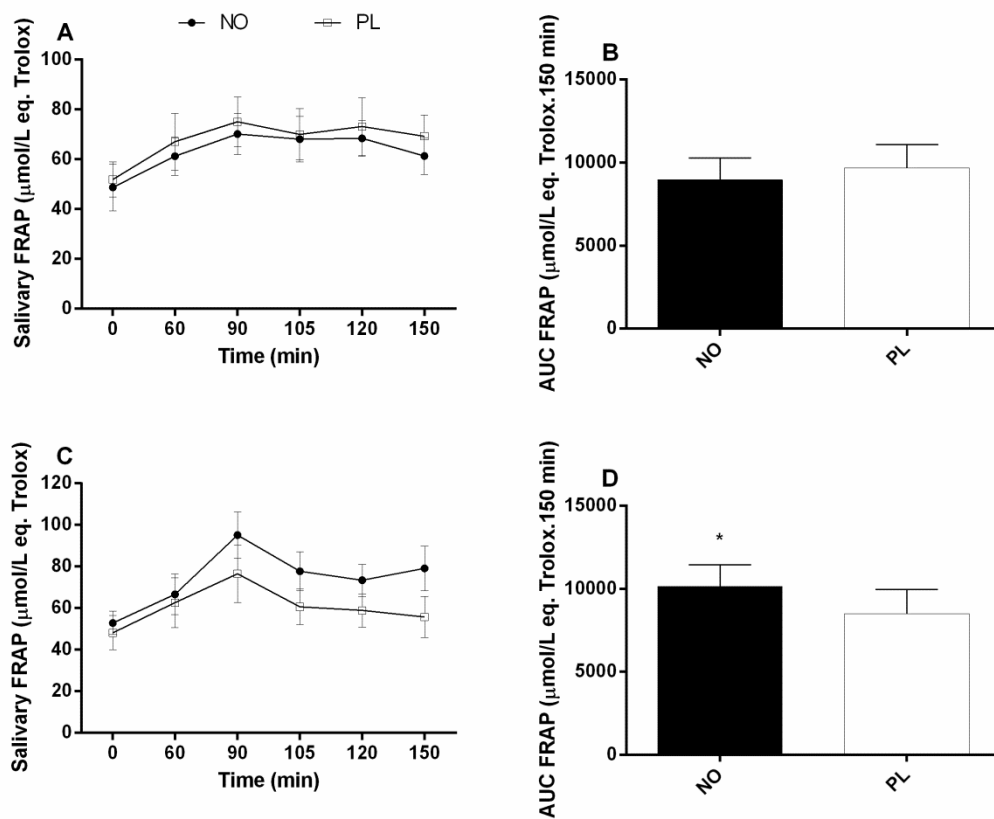


Figure 9 – Total antioxidant capacity (FRAP) during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve in AC (B) and FD (D) treatments. * Difference from PL group ($P < 0.05$).

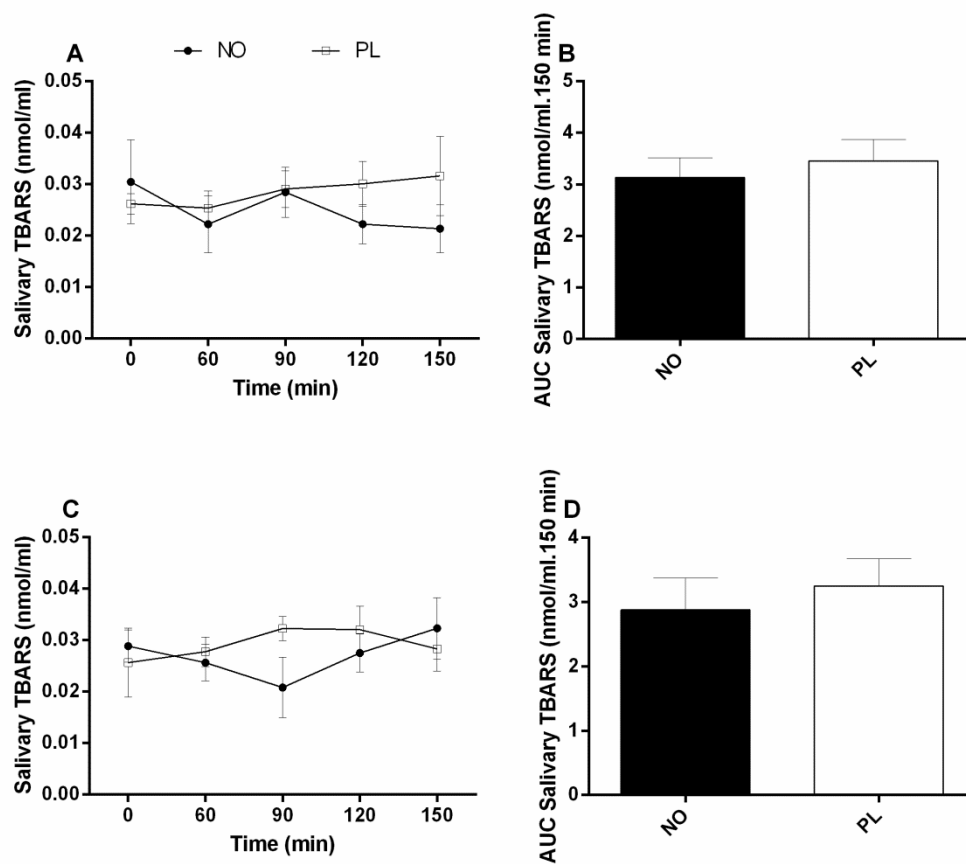


Figure 10 – Lipid Peroxidation (TBARS) during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve in AC (B) and FD (D) treatments.

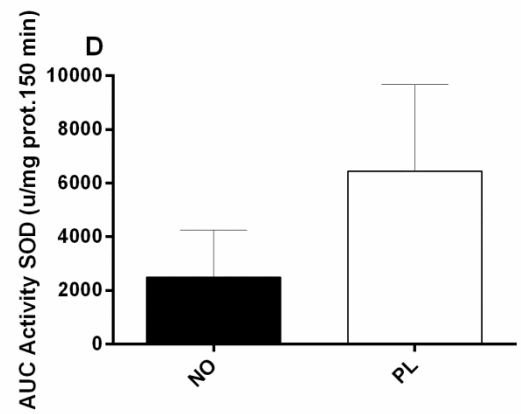
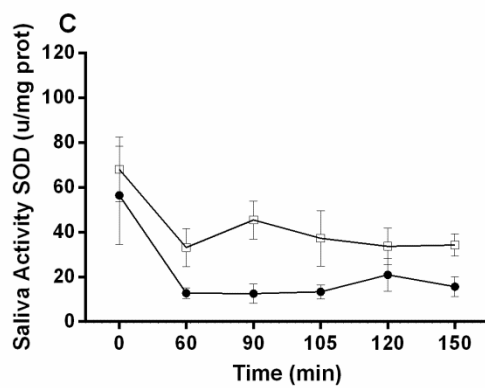
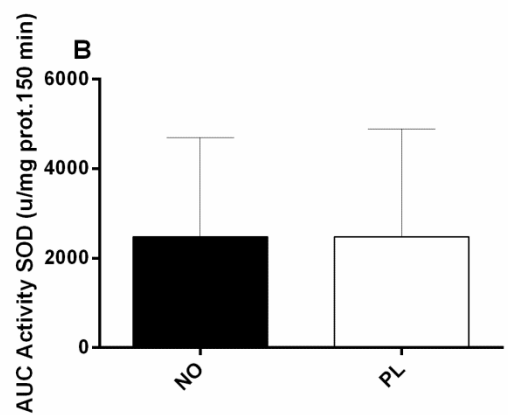
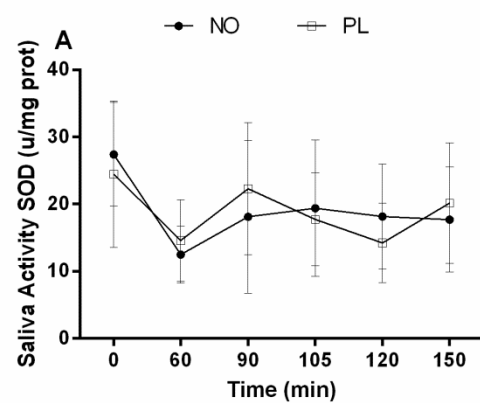


Figure 11 – Salivary SOD activity during AC (A) and FD (C) treatments. Area under curve in AC (B) and (D) treatments.

Anexos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores de intensidade de exercício, estresse oxidativo e variáveis hemodinâmicas de homens fisicamente ativos

Pesquisador: Foued Salmen Espindola

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 37346514.7.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Genética e Bioquímica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.067.144

Data da Relatoria: 10/04/2015

Apresentação do Projeto:

a proposta do estudo é avaliar o efeito da suplementação aguda e após uma semana com nitrato de sódio sobre biomarcadores de intensidade de exercício, estresse oxidativo e variáveis hemodinâmicas. A amostra será composta por 14 homens (20 - 30 anos) fisicamente ativos. Os indivíduos serão submetidos primeiramente a um teste incremental na bicicleta ergométrica para estipularmos a carga máxima. Posteriormente, os mesmos realizarão quatro testes de esforço submáximo (70% da carga máxima) na bicicleta durante 30 minutos com intervalo de 5 dias entre os testes. A suplementação será aleatoriamente administrada com nitrato de sódio ou placebo (cloreto de sódio) a 10 mg. kg⁻¹ de peso corporal de forma duplo cego cruzado durante 5 dias e com um intervalo de uma semana (washout). Serão avaliados biomarcadores de intensidade de exercício, marcadores de estresse oxidativo, pressão arterial e frequência cardíaca.

Hipótese: Que a suplementação com nitrato de sódio irá reduzir os níveis de biomarcadores de intensidade de exercício, marcadores de estresse oxidativo e pressão arterial.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o projeto:

Objetivo Primário: Investigar o efeito da suplementação com nitrato de sódio sobre biomarcadores

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 1.067.144

de intensidade de exercício, estresse oxidativo e variáveis hemodinâmicas.

Objetivo Secundário: Avaliar níveis de alfa-amilase, nitrito, lactato, ácido úrico, bem como marcadores do estresse oxidativo e comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Com relação ao teste físico agudo, não há relatos na literatura sobre eventuais problemas físicos ou psíquicos, durante ou após os testes. Embora a probabilidade de lesões ocorrerem serem mínimas, acreditamos que os indivíduos poderão alcançar níveis de fadiga e cansaço maiores do que seu habitual devido aos esforços submáximos que serão submetidos durante os testes físicos.

Benefícios: Redução da pressão arterial e melhora do desempenho durante os testes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto interessante que faz parte do trabalho do pesquisador: linha de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer 989.147, de 17 de Março de 2015, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: novembro/dezembro de 2015.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

