

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO**

---

**SUPLEMENTAÇÃO DE NITRITO E TREINAMENTO FÍSICO:  
EFEITO CRÔNICO NA PRESSÃO ARTERIAL E NA RIGIDEZ  
ARTERIAL**

**THIAGO PEREIRA DE SOUZA**

**Bauru  
2023**

**THIAGO PEREIRA DE SOUZA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE NITRITO E TREINAMENTO FÍSICO: EFEITO  
CRÔNICO NA PRESSÃO ARTERIAL E NA RIGIDEZ ARTERIAL**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**Orientador: Profº Drº Anderson Saranz Zago**

**Bauru**

**2023**

Souza, Thiago Pereira.

Suplementação de nitrito e treinamento físico: efeito crônico na pressão arterial e na rigidez arterial/ Thiago Pereira de Souza, 2023  
28p.

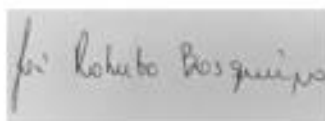
Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp). Faculdade de Ciências, Bauru, 2023.

Orientador: Anderson Saranz Zago

1. eNOS. 2. Exercício físico aeróbio. 3. Velocidade de onda de pulso. 4. Suplementação. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências. II. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de THIAGO PEREIRA DE SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO MOVIMENTO, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 28 dias do mês de março do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE Mestrado de THIAGO PEREIRA DE SOUZA, intitulada **SUPLEMENTAÇÃO DE NITRITO E TREINAMENTO FÍSICO: EFEITO CRÔNICO NA PRESSÃO ARTERIAL E RIGIDEZ ARTERIAL**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Educação Física / UNESP - Faculdade de Ciências de Bauru - SP, Prof. Dr. JOSE ROBERTO BOSQUEIRO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Educação Física / Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP, Prof. Dr. THIAGO JOSÉ DIONÍSIO (Participação Virtual) do(a) Faculdade de Odontologia de Bauru / Universidade de São Paulo - USP, Profa. Dra. KÁTIA DE ANGELIS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fisiologia / Universidade Federal de São Paulo. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. JOSE ROBERTO BOSQUEIRO

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Ademir e Elaine, por sempre me apoiarem em todas as decisões, por estarem sempre comigo, me apoiando em todas as minhas lutas e conquistas. Aos meus tios, Sérgio e Virginia, que sempre foram meus exemplos, foram meus mentores, me incentivando e me apoiando, e mostrando os caminhos das pedras e os atalhos da vida acadêmica. Aos meus avós, que sempre sonharam comigo, foram minha base, sempre colocaram meus sonhos e realizações em suas preces. À minha companheira, Giovana de Alvarenga, que sempre esteve comigo desde o início desta jornada, me apoiando e incentivando a ser cada vez melhor, e me mantendo firme e lutando pelo meu sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Saranz Zago, pela oportunidade, que acreditou no meu potencial e contribuiu imensamente para o desenvolvimento desse trabalho e foi fundamental para a minha formação. Aos meus colegas da Pós-graduação e membros dos CEDEE, que me auxiliaram nos momentos de coleta e análises, não medindo esforços para que desenvolvesse uma melhor pesquisa. Em especial ao meu colega, Rafael Nicoletti, que sempre foi meu braço direito, e participou ativamente de todas as etapas de minha pesquisa, sempre nos apoiando a seguir em frente e buscar sempre mais. Um agradecimento aos membros do Laboratório Experimental de Fisiologia do Exercício (LEFEx), em especial a Prof. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso, e sua aluna Francine Duchatsch, por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho, que inúmeras vezes me receberam de portas abertas e com paciência para esclarecer minhas dúvidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Movimento – UNESP/Bauru pela oportunidade de cursar o Mestrado e por todo o corpo administrativo que esteve sempre presente e pronto para me auxiliar. Ao CNPq pelo apoio financeiro referente ao desenvolvimento do presente trabalho. Por fim, à todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa, e a todos que acreditaram e estiveram ao meu lado, muito obrigado.

## RESUMO

O óxido nítrico (NO), desempenha importante função no controle da pressão arterial (PA). Estudos experimentais demonstraram que a produção de NO, no organismo pode ocorrer por duas vias metabólicas: a) pela via eNOS/NO, através do estresse de cisalhamento nas células do endotélio vascular, influenciada pelo treinamento físico, a partir do aumento da expressão do gene da eNOS e; b) pela via Nitrato/Nitrito/NO, estimulada através da administração oral de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito de 8 semanas de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, administrado pela via oral, associado ao treinamento físico (TF) aeróbio nas variáveis hemodinâmicas e bioquímicas. 40 Ratos Wistar, divididos em quatro grupos (n=10): sedentário controle (SC), sedentário tratado (SN), treinado controle (TC) e treinado tratado (TN). Os animais foram submetidos por 8 semanas de treinamento físico associados com a suplementação de nitrito (15mg/kg) ou placebo (água). Foram avaliadas as variáveis de capacidade física, rigidez arterial, pressão arterial, concentrações de nitrito plasmático e tecidual (coração, aorta, músculos esqueléticos, tibial anterior e sóleo) e substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados foram apresentados como média, desvio padrão e, uma Análise de Variância (ANOVA) de dois caminhos foi realizada para comparação dos grupos. Em relação a rigidez arterial, os resultados demonstraram os grupos que recebeu suplementação de nitrito (SN vs SC, 5.47 vs 6.65, respectivamente, p= 0.008, em m/s), realizou treinamento físico (TC vs SC, 5.37 vs 6.65, respectivamente, p= 0.002, em m/s), foram eficazes em apresentar valores menores de rigidez arterial, comparado ao grupo sedentário. E associação não promoveu resultados adicionais aos já encontrados separadamente. A capacidade física dos animais aumentou com o treinamento físico, demonstrando a eficácia do treinamento (TN vs SN, 963 vs 570, p= <0.001; TC vs SC, 894 vs 609, p=0.003, em s). No que se diz respeito as concentrações de nitrito, a suplementação foi eficaz em aumentar os níveis de nitrito nos tecidos analisados, plasma, músculo tibial anterior e sóleo. Para a variável TBARS, o treinamento físico associado com a suplementação de nitrito apresentou valores menores comparado ao grupo que realizou somente o treinamento físico (TN vs TC, 0.213 vs 0.238, p= 0.013, em µmol/mg) e a suplementação de forma isolada (TN vs SN, 0.213 vs 0.252, p= 0.001, em µmol/mg). Em conclusão, apesar de ambas as intervenções não exerceram efeitos na pressão arterial, frequência cardíaca em repouso e balanço autonômico, há indícios que promovem outros benefícios cardiovasculares, especialmente na redução da rigidez arterial e aumento das concentrações de NO.

**PALAVRAS-CHAVE:** eNOS; Treinamento Aeróbio; Suplementação; Velocidade de Onda de Pulso.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO), plays an important role in controlling blood pressure (BP). Experimental studies have demonstrated that the production of NO in the organism may occur by two metabolic pathways: a) by the eNOS/NO pathway, through shear stress in vascular endothelium cells, influenced by physical training, from the increase of eNOS gene expression and; b) by the Nitrate/Nitrite/NO pathway, stimulated by oral administration of nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). The present study aimed to study the effect of 8 weeks of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, orally administered, associated with aerobic physical training (PT) on hemodynamic and biochemical variables. 40 Wistar rats, divided into four groups (n=10): sedentary control (SC), sedentary treated (SN), trained control (TC) and trained treated (TN). The animals were submitted to 8 weeks of physical training associated with nitrite (15mg/kg) or placebo (water) supplementation. Physical capacity, arterial stiffness, blood pressure, plasma and tissue nitrite concentrations (heart, aorta, skeletal muscles, anterior tibial and soleus) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were evaluated. The results were presented as mean, standard deviation, and a two-way Analysis of Variance (ANOVA) was performed to compare the groups. Regarding arterial stiffness, the results showed the groups that received nitrite supplementation (SN vs SC, 5.47 vs 6.65, respectively, p= 0.008, in m/s), performed physical training (TC vs SC, 5.37 vs 6.65, respectively, p= 0.002, in m/s), were effective in presenting lower arterial stiffness values, compared to the sedentary group. And association did not promote additional results to those already found separately. The physical capacity of the animals increased with physical training, demonstrating the efficacy of training (TN vs SN, 963 vs 570, p= <0.001; TC vs SC, 894 vs 609, p=0.003, in s). With regard to nitrite concentrations, supplementation was effective in increasing nitrite levels in the analyzed tissues, plasma, anterior tibial muscle and soleus. For the TBARS variable, exercise training associated with nitrite supplementation showed lower values compared to the group that received only exercise training (TN vs TC, 0.213 vs 0.238, p= 0.013, in μmol/mg) and supplementation alone (TN vs SN, 0.213 vs 0.252, p= 0.001, in μmol/mg). In conclusion, although both interventions had no effects on blood pressure, resting heart rate and autonomic balance, there is evidence that they promote other cardiovascular benefits, especially in reducing arterial stiffness and increasing NO concentrations.

**KEYWORDS:** eNOS; Aerobic Trainig; Supplementation; Pulse Wave Velocity.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>4 HIPÓTESE</b>	<b>13</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
5.1 ANIMAIS	13
5.2 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA	13
5.3 TREINAMENTO FÍSICO E TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	14
5.4 AVALIAÇÃO DA RIGIDEZ ARTERIAL	15
<b>5.5 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA</b>	<b>15</b>
5.5.1 Confeção de cânulas e Cirurgia de implantação	15
5.5.2 Registro de pressão arterial e Frequência Cardíaca	16
5.5.3 Análise Espectral	16
5.6 EUTANÁSIA	16
5.7 RETIRADA DE MÚSCULOS ESQUELÉTICOS, CORAÇÃO E PLASMA	17
5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	17
5.8.1 Análise das Concentrações de Nitrito Plasmático e tecidual	17
5.8.2 Análise dos Biomarcadores do Estresse Oxidativo	17
<b>5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>18</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>18</b>
6.1 Peso corporal	18
6.2 Capacidade Física Máxima	19
6.3 Medida de Rigidez Arterial	19
6.4 Pressão arterial e modulação simpato-vagal	20
6.5 Concentrações Nitrito plasmático e tecidual	21
6.6 Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	22
<b>7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b>	<b>23</b>



<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE.....</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A pressão arterial (PA) é a força exercida pelo fluxo sanguíneo contra as paredes internas dos vasos sanguíneos, resultante do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, sendo que, quaisquer alterações nesses dois parâmetros poderão interferir nos valores pressóricos (PERUMAREDDI, 2019; JAMES; GERBER, 2018; MARKMAN et al., 2021). Em indivíduos saudáveis, os valores limítrofes são de 140 mmHg, para pressão arterial sistólica (PAS) e 90 mmHg, para pressão arterial diastólica (PAD). Valores acima dos citados estão relacionados a ocorrência de eventos cardiovasculares e mortalidade, tais como acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio (IAM), entre outras (AL-QATATSHEH et al., 2020; FAN; LIU; ZHANG, 2019; YANO et al., 2017; VISCHER; BURKARD, 2017). O treinamento físico, é atualmente recomendado como forma de prevenção da hipertensão arterial sistêmica (HAS) em indivíduos normotensos saudáveis e, como forma de tratamento não farmacológico para pacientes já diagnosticados, uma vez que o treinamento físico regular promove diversos benefícios para a saúde cardiovascular, em especial, na diminuição dos valores de PA, pois estaria atuando na melhora da resistência vascular periférica, maior complacência arterial e redução da atividade nervosa simpática (PAULA et al., 2020; LIN; LEE, 2018; LATERZA et al., 2017; KORSAGER LARSEN; MATCHKOV, 2016). Além dos benefícios citados, há uma estreita relação entre o treinamento físico e benefícios ao endotélio vascular, através do aumento da produção e da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso, com efeito vasodilatador, em sua maior parte, sendo produzido pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (GLUVIC et al., 2020; TIAN; MENG, 2019; MÖLLER et al., 2019). Ainda, têm-se observado nesta relação um aumento das substâncias antioxidantes, contribuindo para a redução das espécies reativas de oxigênio (EROS), principal responsável pela redução da biodisponibilidade do NO, inibindo, portanto, a degradação precoce de NO. (AMARAL et al., 2019; HASEGAWA et al., 2018; KORSAGER LARSEN; MATCHKOV, 2016).

Sendo assim, por possuir poder vasodilatador, o NO desempenha importante função no controle da PA. Portanto, obtém-se a necessidade de criar estratégias farmacológicas (administração de nitrito via oral) e não farmacológicas (treinamento físico) para aumentar sua biodisponibilidade no organismo. Estudos experimentais demonstraram que, o aumento das concentrações de NO, no organismo pode ocorrer por duas vias metabólicas: a) pela via da eNOS/NO/GMPc, em que, sua produção ocorre pela

estimulação do estresse de cisalhamento (shear stress) nas células do endotélio vascular, com grande influência da prática regular de exercício físico, estimulando o aumento da expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (LING et al., 2018); e; b) pela via Nitrato/Nitrito/NO, estimulada através da administração oral de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), (AMARAL et al., 2019; PINHEIRO; TANUS-SANTOS; CASTRO, 2017).

A produção de NO pela via eNOS, têm grande influência da prática de exercício físico, por estímulos físicos devido ao aumento de fluxo sanguíneo e a consequente promoção do estresse de cisalhamento, conhecido como “*shear stress*”, sendo este, a força exercida pelo sangue na parede dos vasos sanguíneos. Logo, ativando a sinalização da enzima eNOS, a qual converte a L-arginina em NO (AREFIAD et. al., 2022; KIANI et. al., 2022; GREEN et. al., 2018; SUVORAVA et. al., 2018).

A produção de NO pela via Nitrato/Nitrito/NO, têm como fonte a própria administração de NO. Inicialmente, o nitrito ingerido gera NO em condições ácidas no estômago, enquanto o restante entra na circulação sanguínea. Nos tecidos, em condições de baixo pH e hipóxia por proteínas de redutase de nitrito para NO, processos denominados pela literatura como “ciclo êntero-salivar dos nitratos e nitritos” (GUIMARAES; BATISTA; TANUS-SANTOS, 2021; PIGNATELLI et al., 2020), promovem vasodilatação, efeitos anti-hipertensivos, antioxidantes e melhora da função miocárdica por mecanismos que envolvem a inibição da atividade da NADPH oxidase, por meio de uma bioativação do nitrito dependente da xantina oxidase (GUIMARAES; BATISTA; TANUS-SANTOS, 2021; PINHEIRO et al., 2021). A administração oral de nitrito por mais de duas semanas, é considerado um método de tratamento crônico e tem demonstrado vantagens em ser utilizada em comparação a outros doadores de NO, tendo uma bioativação mais eficientes em situações de hipóxia e condições de estresse oxidativo, enquanto o NO orgânico produzido pela eNOS tem maior probabilidade de gerar a formação do peroxinitrito, promovendo efeitos negativos para função vascular (LING; MUSTAFA; MURUGAN, 2020; MÜNZEL; DAIBER, 2018).

Outro fator que também possui grande influência nos valores de PA é a rigidez arterial, sendo caracterizada pela perda de complacência das paredes arteriais (LACOLLEY et al., 2017; LAURENT; BOUTOUYRIE, 2020). Além disso, é considerado um importante preditor de risco de mortalidade por todas as causas e mortalidades cardiovasculares, não apenas em populações com doenças, como

hipertensão, por exemplo, mas também na população em geral (JI et al., 2020; LEBLANC; STRONG; TABRIZCHI, 2018; LINDESAY et al., 2016). Estudos, sugerem que os mecanismos pelos quais a administração oral de nitrito e treinamentos físicos aeróbios possivelmente influenciam na melhora da rigidez arterial estão relacionados ao melhora da função endotelial (DUPONT et al., 2019; HASEGAWA et al., 2018).

Em estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório (em fase de publicação), com ratos Wistar treinados por 8 semanas (treinamento aeróbio em esteira) e suplementados com 15mg/kg de nitrito de sódio via oral (mesma concentração do projeto atual), nos últimos 6 dias de protocolo, os resultados demonstraram que os animais que receberam somente o tratamento com nitrito e os animais que concomitantemente receberam tratamentos e treinamentos físicos, apresentaram redução da rigidez arterial (avaliada a partir da medida da velocidade de onda de pulso) quando comparado aos momentos pré e pós-administração. Os animais que, somente, receberam o tratamento, apresentaram redução dos valores de PA em comparação ao seu grupo controle. Apesar deste estudo, apresentar resultados positivos, ainda não foi possível determinar se esses resultados estão relacionados à suplementação, ao tempo em que o nitrito foi administrado, ao exercício ou à combinação entre eles. Ainda, os mencionados mecanismos fisiológicos que relacionam as alterações necessitam de maiores esclarecimentos. Diante das respectivas indagações, optou-se neste projeto, em aumentar o tempo de suplementação de nitrito, coincidindo com o tempo de treinamento físico para maior clareza dos efeitos da suplementação, treinamento e/ou combinação entre eles.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Devido a HA ser um importante fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, sendo estas, patologias de alto índice de mortalidade mundial, têm-se a necessidade de investigar os mecanismos de controle de pressão arterial. Sabe-se que, o treinamento físico aeróbio e a suplementação de nitrito, são sugeridos como formas de controle de pressão arterial em pessoas já diagnosticadas e, também, como meio de prevenção em pessoas saudáveis. Considerando este conhecimento presente na literatura, até o momento ainda não se tem conhecimento de estudos que objetivaram estudar a associação de ambos os tratamentos e os mecanismos pelos quais eles atuam, sendo necessários maiores esclarecimentos científicos.

Em termos gerais, o entendimento dos mecanismos relacionados a suplementação de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> associado a prática de exercícios físicos, o tempo de administração de ambos e, como eles atuam na regulação da pressão arterial e na disfunção endotelial podem ser fatores primordiais para a prevenção/tratamento da HA. Ainda, é importante mencionar que, para o presente estudo, a opção por utilizar ratos Wistar normotensos é devido à necessidade do entendimento dos mecanismos de controle da PA relacionados à suplementação de NO e ao treinamento físico no organismo dito “normal”. Num segundo momento, os conhecimentos adquiridos poderão ser aplicados em ratos hipertensos.

Ressalta-se também que, este estudo faz parte de uma pesquisa translacional de longo prazo que buscará estabelecer tais relações tanto no modelo animal (presente estudo) quanto no modelo humano através da prática do exercício físico e da suplementação de alimentos ricos em nitrito/nitrato (beterraba, rúcula dentre outros), não explorados por este projeto.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal da presente pesquisa científica é, verificar o efeito da administração oral de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) associado com o treinamento físico nas variáveis hemodinâmicas e humorais em ratos Wistar normotensos após oito semanas de intervenção.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

A partir do objetivo geral, foram definidos dois objetivos específicos. Sendo:

1. Verificar os efeitos do treinamento físico e administração oral de nitrito, de forma isolada ou combinada, nas concentrações de nitrito plasmático e tecidual e seus possíveis reflexos na pressão arterial.
2. Verificar os efeitos do treinamento físico e administração oral de nitrito, de forma isolada ou combinada, na funcionalidade arterial em reduzir a rigidez arterial.

#### **4 HIPÓTESE**

Apesar de ratos Wistar serem considerados animais normotensos, neste trabalho esperávamos que a administração oral de nitrito, quando associado com o treinamento físico, atenuasse e/ou reduzisse a pressão arterial, rigidez arterial nos animais que fossem submetidos a ambas as intervenções. Possivelmente, as intervenções poderiam ser utilizadas como uma estratégia para restaurar as concentrações de NO e reduzir o estresse oxidativo, além de promover diversos benefícios cardiovasculares.

#### **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo é parte de um projeto de pesquisa maior intitulado “Efeito do exercício físico e da suplementação de nitrito no controle cardiovascular de ratos idosos” o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências da UNESP-Bauru (nº 281/2020 Vol.1 – Anexo 1), seguindo as Diretrizes do Conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA).

##### **5.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 40 ratos machos (Wistar) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu, com idade de seis semanas (45 dias), com peso de 200-250 gramas. Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos em gaiolas com até quatro animais, no Biotério da Faculdade de Ciências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Bauru, com ração e água fornecidos ad libitum, em ciclo claro-escuro de 12/12 horas e temperatura controlada de 22°C.

##### **5.2 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA**

Os animais passaram por 10 dias de adaptação à esteira (modificada para ratos, possuindo 10 raias suspensas de ferro, Inbramed, Millennium). Posteriormente, todos os animais realizaram o Teste de Capacidade Máxima (TCM1), através do protocolo adaptado que preconiza aumentos de 3m/min a cada 3 minutos de exercício na esteira até

a exaustão, determinando assim, a capacidade física máxima de forma indireta. Este teste foi repetido após a quarta semana, com objetivo de readaptação das cargas de treinamento (TCM2) e ao final das oito (TCM3) semanas de treinamento aeróbio associado a administração oral de nitrito (NO<sub>2</sub>-).

### 5.3 TREINAMENTO FÍSICO E TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Após a realização do TCM, os animais foram separados em quatro grupos (n=10/grupo), igualmente para peso corporal (PC), capacidade física e valores de rigidez arterial. Sendo formado os seguintes grupos:

- Sedentários Controle (SC): Animais que foram mantidos sedentários por toda o protocolo experimental e receberam o tratamento com placebo (água);
- Sedentários Nitrito (SN): Animais que foram mantidos sedentários por toda o protocolo experimental e receberam a administração oral de nitrito;
- Treinados Controle (TC): Animais submetidos ao treinamento físico e que receberam o tratamento com placebo (água);
- Treinados Nitrito (TN): Animais submetidos ao treinamento físico e que receberam a administração oral de nitrito;

Os animais foram submetidos a 8 semanas de treinamento físico, com intensidade de 50-60% da velocidade máxima atingida no teste de TCM e foi concomitantemente realizado a administração oral de nitrito de sódio (15mg/kg) ou placebo (água), administrada pelo método de gavagem. A escolha da água como placebo e a concentração do nitrito de sódio concordam com os estudos publicados anteriormente, que demonstraram os efeitos anti-hipertensivos e antioxidantes do composto (AMARAL et al., 2019; NETO-NEVES et al., 2019; PINHEIRO et al., 2020; RIZZI et al., 2019). A suplementação ocorreu às 9 horas da manhã, 60 minutos antes dos animais iniciarem o treinamento físico diário na esteira.

O treinamento foi realizado seguindo o seguinte desenho experimental:

## Treinamento Físico e Suplementação de nitrito (8 semanas)

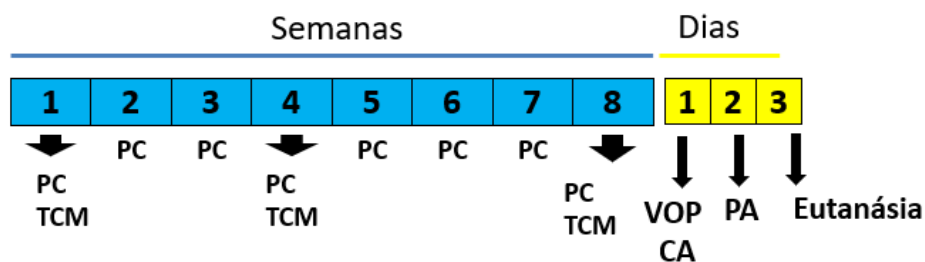


Figura 1 - Protocolo Experimental (PC – peso corporal; TCM – Teste de capacidade máxima; VOP – Velocidade de onda de pulso; CA – Cirurgia de Canulação; PA direta – Registro de Pressão Arterial).

### 5.4 AVALIAÇÃO DA RIGIDEZ ARTERIAL

A avaliação da rigidez arterial aconteceu no início do protocolo e ao final das 8 semanas. Para isso, os animais foram anestesiados com ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 10mg/kg), CEVA e DOPALEN® (cloridrato de Cetamina, 50mg/kg), VETBRANDS do Brasil (na proporção de 1:1, 0,1mg/100g de peso corporal) e posicionados em decúbito ventral sobre uma mesa aquecedora. Com um dos sensores posicionados na pata dianteira e outro na pata traseira do animal, foi avaliada a diferença da velocidade de onda de pulso (VOP) entre membros superiores e inferiores pelo dispositivo Popmètre para animais de pequeno porte. A VOP foi analisada pelo software pOpMET 1.0 (TousDroits reserves®, Axelifé SAS 2013), ajustado conforme a distância medida entre os sensores. Esta avaliação destinada a avaliar a rigidez arterial validada recentemente, demonstrando ser uma boa ferramenta para tal avaliação (Fabricio et al., 2020).

### 5.5 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

#### 5.5.1 Confeção de cânulas e Cirurgia de implantação.

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno, Tygon PE 50 (Scientific Commodities Inc.) e Tygon PE 10 (Scientific Commodities Inc), que foram previamente soldados.

Imediatamente, após a medida de rigidez arterial, como os animais já estavam anestesiados, realizou-se o procedimento cirúrgico de implantação da cânula para a



medição da pressão arterial. Quando necessário, os animais recebiam repiques com ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 10mg/kg), CEVA e DOPALEN® (cloridrato de Cetamina, 50mg/kg), VETBRANDS do Brasil (na proporção de 1:1, 0,1mg/100g de peso corporal). Os animais foram posicionados de decúbito ventral para realização da incisão e dissecação da artéria femoral esquerda. Após a cirurgia a cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Em procedimento pós-operatório, para analgesia foi aplicado anti-inflamatório flunixinina (Banamine 2,5 mg/kg, i.m.), caso houvesse necessidade.

### 5.5.2 Registro de pressão arterial e Frequência Cardíaca

Após 24h do procedimento cirúrgico, com os animais acordados, foi registrada a pressão arterial direta, pela ligação da cânula da artéria femoral ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador, AD instruments®), e conectado ao um computador (software Lab Chart Pro).

### 5.5.3 Análise Espectral

A partir do registro em série da Pressão Arterial (PA) e do Intervalo de Pulso (IP) obtidas a partir de gravações de 40 minutos com frequência de 2000 Hz, por meio do software LabChartPro, foi possível realizar a análise de tempo-frequência da variabilidade da PAS (VPAS). A análise de variabilidade em domínios de frequência de tempo foi processada usando o software (CardioSeries V2.7 - 2020), da Universidade de São Paulo, Brasil.

## 5.6 EUTANÁSIA

A eutanásia ocorreu 24h após a última dose de administração oral de nitrito. Os animais foram eutanasiados por excesso de anestésicos, com ANASEDAN® (cloridrato de xilasina, 40mg/kg), e DOPALEN® (cloridrato de ketamina, 160mg/kg), VETEBRANDS do Brasil (proporção de 1:1, 0,1mg/100g de peso corporal), logo após, realizou-se a decapitação.

## 5.7 RETIRADA DE MÚSCULOS ESQUELÉTICOS, CORAÇÃO E PLASMA

No momento da eutanásia foram removidos, limpos e imediatamente pesados o coração, e os músculos esqueléticos, tibial anterior e sóleo, e armazenados em freezer -80°C para futuras análises.

Ainda, foi coletado 5 ml de sangue para análise das concentrações de nitrito. Logo após a coleta, o sangue foi centrifugado a 4000 rotações por minuto ao longo de 5 minutos e o plasma armazenado em um freezer -80°C.

## 5.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 5.8.1 Análise das Concentrações de Nitrito Plasmático e tecidual

Conforme dito anteriormente, após a eutanásia foram coletados o músculo cardíaco (ventrículo esquerdo), os músculos esqueléticos tibial anterior e sóleo e 5 ml de sangue para análise das concentrações de nitrito. O plasma, 125mg de tecido cardíaco e muscular foram homogeneizados em tampão fosfato. Após a centrifugação, a solução contendo os tecidos ou alíquotas de plasma foi analisada em duplicata quanto às concentrações de nitrito usando o método de quimiluminescência reductiva à base de ozônio e foi posteriormente avaliada por um analisador de quimiluminescência de fase gasosa (analisador Sievers Modelo 280 NO; Boulder, CO, EUA), conforme descrito previamente (PINHEIRO et al., 2020; SANCHES-LOPES et al., 2020).

### 5.8.2 Análise dos Biomarcadores do Estresse Oxidativo

Para a avaliação dos Biomarcadores do estresse oxidativo, a análise utilizada foi para a quantificação da presença de ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas amostras. Foi adicionada 750µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (P/V) a 250µL de amostra de plasma para ocorrer a reação. O TCA tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação. Essa mistura foi agitada e centrifugada durante 10 minutos a 4000rpm. Retirando-se 500µL do sobrenadante e adicionada 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), ao qual reagiu com os produtos da peroxidação lipídica formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 30

minutos a 100°C e em seguida resfriada em gelo, para posterior leitura da absorvância a 535nm em espectrofotômetro (Biospectro).

## 5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em média  $\pm$  DP. A análise ANOVA de dois caminhos foi utilizada para identificar diferenças estatísticas na rigidez arterial, pressão arterial e concentrações de nitrito plasmático e teciduais entre os grupos, considerando o treinamento e o tratamento farmacológico como variáveis independentes. O nível de significância foi definido como  $p \leq 0,05$ . Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SigmaPlot 12.0 (Systac Software, Inc., San Jose, CA, EUA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Peso corporal

A figura 1 apresenta os valores de peso corporal dos animais nos momentos inicial (1A) e final do protocolo experimental (1B). Os grupos não apresentaram diferenças significativas dentro dos respectivos grupos, somente apresentando diferenças quando comparados aos momentos pré e pós o programa.

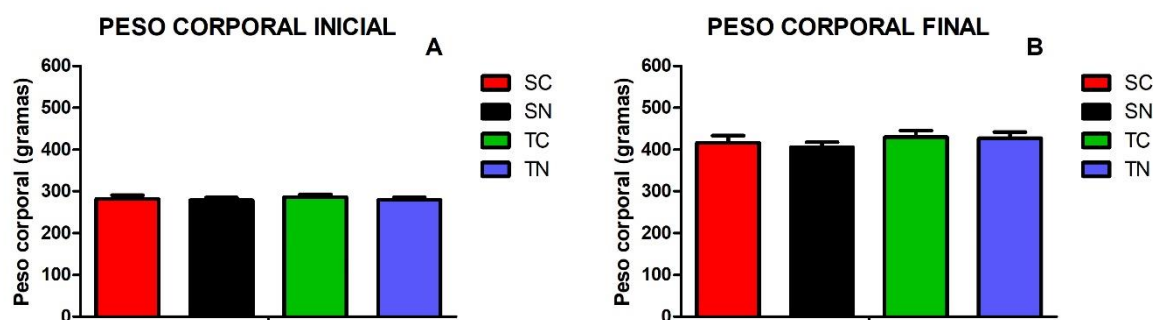


Figura 1: Peso corporal inicial (1A) e final (1B), em SC (Sedentário-Control), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Control), e TN (Nitrito Treinado).  $p < 0,05$ .

## 6.2 Capacidade Física Máxima

A capacidade física máxima dos animais foi avaliada em três momentos distintos (início, 4 semanas e 8 semanas). No início do protocolo (Figura 2A) não foi constatada diferenças entre os grupos, confirmando a homogeneidade dos animais e grupos.

Os resultados da avaliação em 4 semanas (Figura 2B) e após 8 semanas (Figura 2C) demonstraram que ambos os grupos que realizaram o treinamento físico aeróbio aumentaram a capacidade física dos animais (TN vs SN, 963s  $\pm$  309s vs 570s  $\pm$  136s,  $p < 0.001$ ; TC vs SC, 894s  $\pm$  193s vs 609s  $\pm$  154s,  $p = 0.003$ ). A suplementação de nitrito ao longo de 8 semanas não proporcionou benefícios adicionais ao grupo que realizou a associação com o treinamento (TN vs TC, 963s  $\pm$  309s vs 894s  $\pm$  193s,  $p = 0.441$ ).

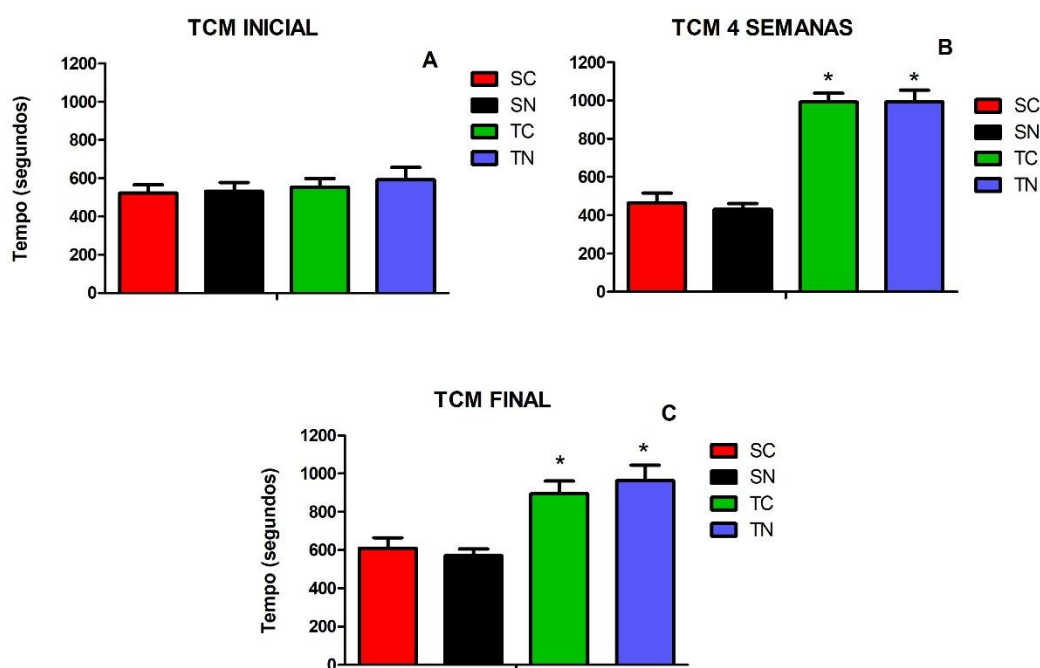


Figura 2: Teste de capacidade máxima (TCM), inicial (2A), em 4 semanas (2B) e final (2C), em SC (Sedentário-Controle), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Controle), e TN (Nitrito Treinado). Diferenças estatísticas: \*vs respectivo controle;  $p < 0,05$ .

## 6.3 Medida de Rigidez Arterial

A figura 3 evidencia os valores de velocidade de onda de pulso (VOP) no momento inicial (3A), demonstrando não haver diferenças entre os grupos antes de iniciar o protocolo experimental ( $p = 0.785$ ).

Ao final do programa (Figura 3B), observa-se que ambos os grupos que realizaram o treinamento físico (TN e TC) e o grupo que recebeu somente a suplementação de nitrito (SN) apresentam valores menores de VOP quando se comparado com o grupo “sedentário controle” (TC vs SC,  $5.37\text{m/s} \pm 0.77\text{m/s}$  vs  $6.65\text{m/s} \pm 0.85\text{m/s}$ ,  $p= 0.002$ ; e SN vs SC,  $5.47\text{m/s} \pm 0.36\text{m/s}$  vs  $6.65\text{m/s} \pm 0.85\text{m/s}$ ,  $p= 0.008$ ). Cabe a ressalva que o grupo que recebeu a associação do treinamento físico e suplementação de nitrito (TN), não apresentou efeitos adicionais aos já encontrados de forma isolada.

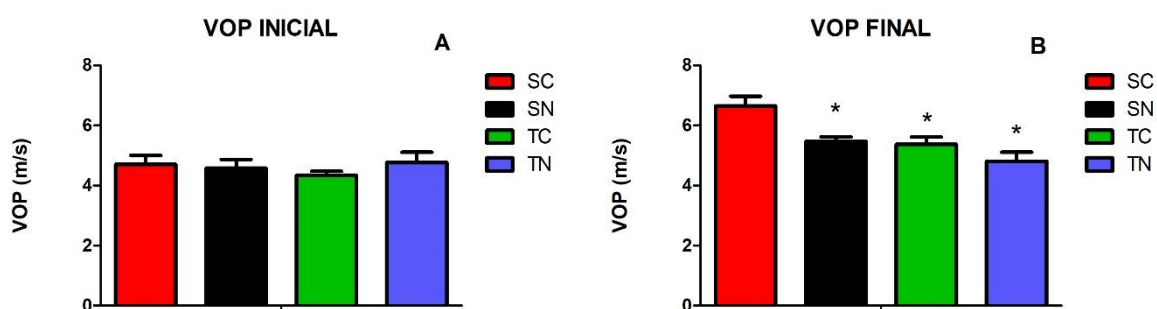


Figura 3: Velocidade de onda de pulso (VOP), antes de iniciar o programa (3A) e ao final (3B), em SC (Sedentário-Controle), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Controle), e TN (Nitrito Treinado). Diferenças estatísticas: \*vs SC;  $p < 0,05$ .

#### 6.4 Pressão arterial e modulação simpato-vagal

A figura 4 evidencia os valores de pressão arterial sistólica (4A), frequência cardíaca em repouso (4B) e modulação simpato-vagal (4C), ambas avaliadas ao final do protocolo, demonstrando que, o treinamento físico e a suplementação de nitrito de forma isolada ou ambos associados, não promoveram benefícios em relação à pressão arterial sistólica ( $p= 0.846$ ), frequência cardíaca ( $p=0.743$ ) e LF/HF ( $p=0.393$ ). Tais resultados já eram esperados, considerando o fato de os animais serem normotensos.

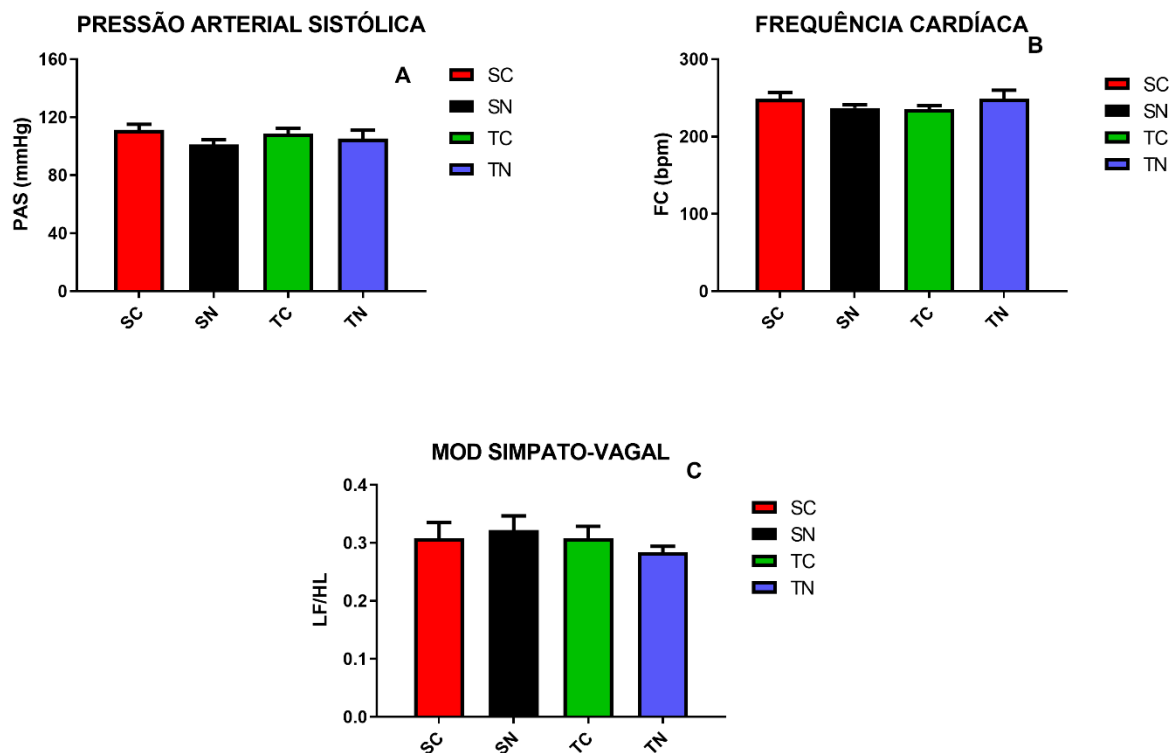


Figura 4: Pressão Arterial Sistólica (PAS - 4A), Frequência Cardíaca (FC - 4B), Balanço Autonômico (LF/HF - 4C) ao final do programa, em SC (Sedentário-Control), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Control), e TN (Nitrito Treinado).

### 6.5 Concentrações Nitrito plasmático e tecidual

Os resultados evidenciaram que, os grupos suplementados com nitrito associados ao treinamento físico apresentaram maiores concentrações de nitrito em comparação a seus grupos controles, no plasma (TN vs TC,  $0.872 \pm 0.54$  vs  $0.417 \pm 0.1$ ,  $p= 0.034$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ; e SN vs SC,  $0.837 \pm 0.63$  vs  $0.510 \pm 0.11$ ,  $p= 0.031$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) e músculo sóleo (TN vs TC,  $5.64 \pm 1.37$  vs  $4.00 \pm 1.16$ ,  $p= 0.027$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ; e SN vs SC,  $5.34 \pm 1.93$  vs  $3.54 \pm 0.71$ ,  $p= 0.033$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ). No músculo tibial anterior, os resultados demonstram que seus benefícios foram a partir do treinamento físico, uma vez que os animais que realizaram somente o treinamento ou que tiveram suas associações com a suplementação, apresentaram maiores concentrações de nitrito (TN vs SN,  $5.33 \pm 2.08$  vs  $3.20 \pm 0.87$ ,  $p= 0.026$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ; e TC vs SC,  $5.04 \pm 0.58$  vs  $2.60 \pm 0.46$ ,  $p= 0.013$ , em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ).

No ventrículo esquerdo não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ( $p= 0.678$ ).

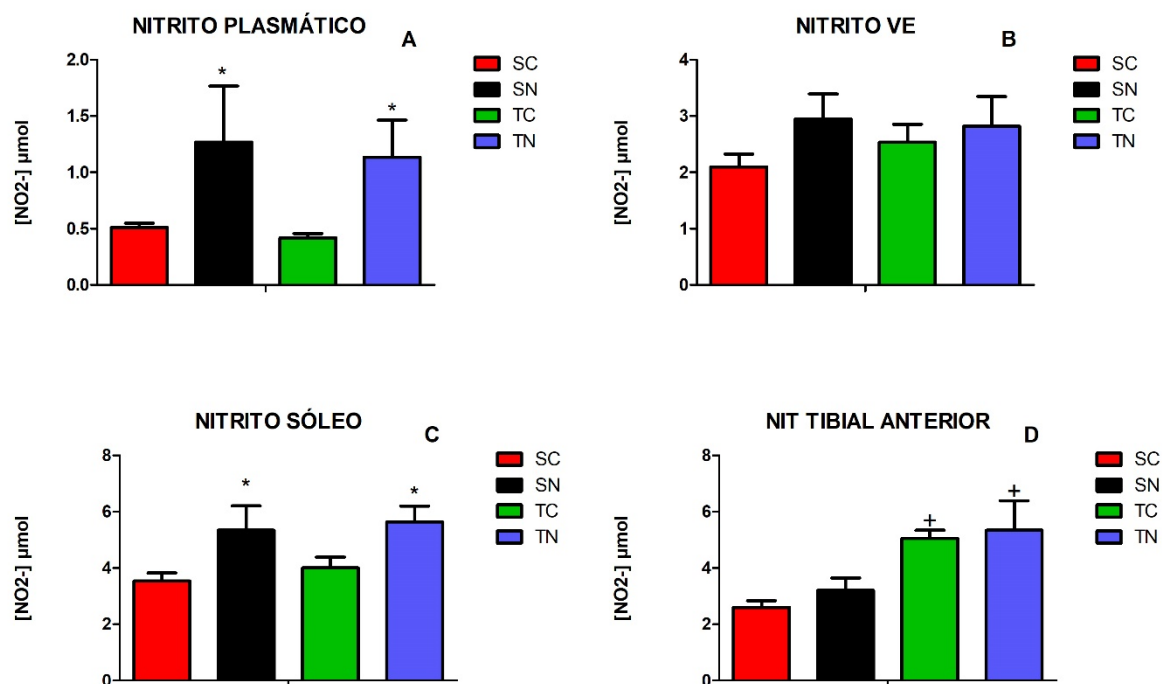


Figura 5: Nitrito Plasmático (5A), Nitrito VE (5B), Nitrito Sóleo (5C), Nitrito TA (5D), em SC (Sedentário-Control), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Control), e TN (Nitrito Treinado). Diferenças significativas: \* vs respectivo controle; + vs respectivo sedentário;  $p < 0,05$ .

## 6.6 Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A figura 6 evidencia os valores de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), avaliada ao final do protocolo após a eutanásia, demonstrando que o treinamento físico associado com suplementação de nitrito promoveu benefícios em relação ao TBARS, apresentando valores menores do que comparado ao grupo que realizou somente o treinamento físico (TN vs TC,  $0,213 \pm 0,02$  vs  $0,238 \pm 0,02$ ,  $p = 0,013$ , em  $\mu\text{mol/mg}$ ) e a suplementação de forma isolada (TN vs SN,  $0,213 \pm 0,02$  vs  $0,252 \pm 0,02$ ,  $p = 0,001$ , em  $\mu\text{mol/mg}$ ). Do mesmo modo, o grupo controle apresentou níveis menores de TBARS comparado ao sedentário suplementado com nitrito (SC vs SN,  $0,221 \pm 0,02$  vs  $0,252 \pm 0,02$ ,  $p = 0,005$ , em  $\mu\text{mol/mg}$ ).

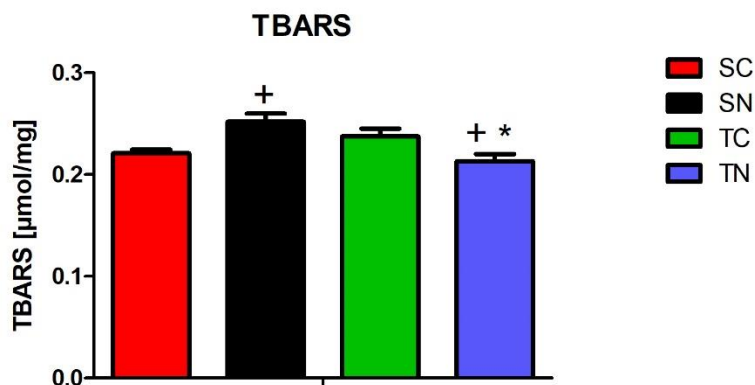


Figura 6: Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), em SC (Sedentário-Controlle), SN (Sedentário-Nitrito), TC (Treinado-Controlle), e TN (Nitrito Treinado). Diferenças significativas: \* vs respectivo controle; + vs sedentário.

## 7. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos da administração oral de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) associado com o treinamento físico nas variáveis hemodinâmicas e humorais em ratos Wistar normotensos. Este é um dos primeiros estudos a se propor investigar os efeitos da administração de nitrito e o treinamento físico após 8 semanas, nas variáveis de pressão arterial, rigidez arterial, concentrações de nitrito plasmático e tecidual.

Contudo, como mencionado anteriormente, nossos resultados demonstraram que a administração oral de nitrito e o treinamento físico foram eficazes em atenuar os valores de VOP em comparação ao grupo que não recebeu nenhuma das intervenções. Ou seja, a rigidez arterial aumentou com o avançar da idade, no entanto, os grupos que receberam o tratamento com nitrito ou realizaram o treinamento físico, tais acréscimos foram atenuados. Vale ressaltar que, a associação de ambas as intervenções resultou em aumento de menos de 1%, considerando que os demais grupos apresentaram aumento de mais de 20%, tais resultados sugerem que a associação é mais eficaz em atenuar à rigidez arterial. Os devidos resultados concordam com estudos encontrados na literatura. HASEGAWA et. al. (2018), demonstraram em ratos Sprague–Dawley, que o treinamento físico aeróbico em esteira realizado durante 8 semanas, reduziu os valores de VOP em comparação aos animais controles sedentários, atribuindo o respectivo resultado ao aumento do NO aórtico. Em humanos, também foi evidenciado que o treinamento físico aeróbico diminuiu a rigidez arterial sistêmica de jovens saudáveis (WANG et. al., 2014). Em outro estudo,



com pessoas hipertensas, foi investigado os efeitos de diferentes modalidades de treinamento físico na função endotelial, sendo demonstrado que o treinamento aeróbio realizado por 8 semanas, melhorou a função endotelial em 3,2%, (PEDRALLI et. al., 2020). Os mecanismos fisiológicos pelos quais o treinamento físico regular promove a melhora da função endotelial, podem ser atribuídos ao estresse de cisalhamento, o qual produz maior disponibilidade de NO e promove maior relaxamento arterial (KRESNAJATI et. al., 2022).

Os níveis de nitrito no plasma, revelaram que os animais que receberam o nitrito via oral, mesmo após 24h, mantiveram níveis elevados comparados com os grupos controles, sugerindo que a administração é uma forma eficaz em elevar as concentrações de NO em longos períodos. Pinheiro e colaboradores (2020) já haviam evidenciado em seus estudos que o comportamento do nitrito plasmático é dependente do tempo, atingindo seu pico em torno de 30 minutos após a ingestão, mantendo-se elevado e, retorna a níveis basais 8 horas após a ingestão. De mesmo modo, esse mesmo estudo também demonstrou que, em apenas 4 horas após a ingestão, os níveis de nitrito no coração retornam aos níveis basais, conforme os resultados encontrados em nosso estudo.

No entanto, em tecidos musculares esqueléticos, nossos resultados apontaram que os dois tipos de tecido muscular funcionam de formas diferentes. No músculo tibial anterior, os grupos que realizaram o treinamento físico, apresentaram concentrações de nitrito maiores do que grupos sedentários, não havendo influência da administração oral. Já no músculo sóleo, os grupos que receberam o nitrito, apresentaram concentrações maiores, comparado aos demais grupos. No entanto, os resultados explicam-se, devido à modalidade de treinamento físico aeróbio realizado em esteira, tendo maior estimulação do músculo sóleo, resultando em maior sobrevivência ao nitrito (KORSAGER LARSEN; MATCHKOV, 2016). Logo, consideram-se as diferentes composições das fibras musculares em cada tecido. O músculo sóleo tem em sua composição, predomínio de fibras do tipo I, com características oxidativas. Já o músculo tibial anterior, tem em sua composição, predomínio de fibras do tipo II, com características do metabolismo glicolítico. Diversos estudos demonstram que, devido aos níveis de substâncias antioxidantes das fibras do tipo I, o sistema aumenta a capacidade de eliminação de ROS, proporcionando uma maior disponibilidade do nitrito (THIRUPATHI et al., 2020; POWERS et al., 2016).

Em relação ao estresse oxidativo, os resultados das substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), um oxidante resultante da peroxidação lipídica, demonstraram

que o treinamento físico combinado com a suplementação promoveu maiores benefícios quando comparado às intervenções de foram isoladas. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de o exercício físico ajudar a metabolizar e reduzir o estresse oxidativo, a partir do aumento da estimulação do sistema de defesa antioxidante, contribuindo para o balanço redox. Sabe-se que o exercício físico promove a produção de substâncias antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), desempenhando papel essencial na proteção e eliminação de ROS (GOMEZ-CABRERA et. al., 2021; MELO-MARINS et. al., 2021).

Entretanto, Wang (2021), evidencia que a produção de ROS deve acontecer, sendo essenciais para a sinalização celular e as funções fisiológicas, no entanto, a produção excessiva tem diversos efeitos deletérios, sendo um deles, o dano celular. Conclui-se, o exercício físico desempenha papel essencial no reequilíbrio redox.

Relacionando a pressão arterial, como já esperado, foi demonstrado que ambas as intervenções não apresentaram efeitos em animais Wistar. Podendo atribuir a espécie escolhida, animais com características normotensas, que já se encontram em níveis normais. No entanto, esta avaliação se faz importante, pois no presente estudo buscamos entender os efeitos das respectivas intervenções em indivíduos saudáveis. Tais resultados concordam com estudos presentes na literatura, demonstrando não haver reduções nos níveis de pressão arterial em animais normotensos após a realização do treinamento físico. Rodrigues e colaboradores (2018) investigaram os efeitos do treinamento físico aeróbio em esteira durante 8 semanas na pressão arterial de animais normotensos, demonstrando não haver diferenças entre os valores de pré e pós-treinamento físico. Do mesmo modo, JORDÃO e colaboradores (2018) demonstraram que animais Wistar submetidos a treinamento físico aeróbio de natação, ao longo de 10 semanas, o grupo normotenso não apresentou reduções na pressão arterial após o período do treinamento físico. Em relação ao balanço autonômico, nossos resultados evidenciaram não haver diferenças entre os grupos experimentais, pois valores normais de pressão arterial podem ser um reflexo do equilíbrio entre a modulação simpática e parassimpática (FIUZA-LUCES et al., 2018). Contraposto, em animais espontaneamente hipertensos (SHR), é possível observar benefícios significativos do treinamento físico em relação à pressão arterial e balanço autonômico. Todavia, Li e colaboradores (2022) buscaram comparar os efeitos do treinamento intervalado e treinamento contínuo na pressão arterial de pacientes hipertensos, concluindo que, tanto o HIIT como o aeróbio contínuo, apresentam reduções significativas na pressão arterial. Em outro estudo, DUAN e colaboradores (2021)

buscaram investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio de natação ao longo de 8 semanas. Foi constatado, em animais SHR treinados, redução de pressão arterial sistólica nas últimas duas semanas de protocolo experimental.

Em conclusão, nosso estudo demonstra diversos benefícios em conciliar o treinamento físico aeróbio e a administração oral de nitrito, principalmente na atenuação da rigidez arterial, aumento das concentrações de nitrito e redução do estresse oxidativo. Portanto, considerando a devida importância, entender melhor os efeitos de ambas as intervenções, contribui para promover a saúde de pessoas saudáveis ou patológicas. Entretanto, cabe ressaltar que estes resultados têm a necessidade de serem confirmados em animais hipertensos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-QATATSHEH, A. et al. Blood pressure sensors: Materials, fabrication methods, performance evaluations and future perspectives. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 16, p. 1–77, 2020.
2. AMARAL, J. H. et al. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 141, n. May, p. 261–268, 2019.
3. AREFIRAD, T. et al. **Effect of exercise training on nitric oxide and nitrate/nitrite (NOx) production: A systematic review and meta-analysis.** **Frontiers in Physiology**Frontiers Media S.A., , 4 out. 2022.
4. DE MELO-MARINS, D. et al. **Redox balance during exercise in the heat in healthy adults: A systematic review.** **Journal of Thermal Biology**Elsevier Ltd, , 1 jul. 2021.
5. DI MEO, S.; NAPOLITANO, G.; VENDITTI, P. Mediators of physical activity protection against ros-linked skeletal muscle damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, 2 jun. 2019.
6. DUAN, Y. C. et al. Swimming exercise ameliorates hypertension-induced kidney dysfunction via alleviating renal interstitial fibrosis and apoptosis. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 46, n. 2, p. 219–228, 1 abr. 2021.

7. DUPONT, J. J. et al. Sex differences in mechanisms of arterial stiffness. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 21, p. 4208–4225, 2019.
8. FABRICIO, M. F. et al. Standardization of a new non-invasive device for assessment of arterial stiffness in rats: Correlation with age-related arteries' structure. **MethodsX**, v. 7, p. 100901, 2020.
9. FAN, H.; LIU, Y.; ZHANG, X. Validation of recommended definition in identifying elevated blood pressure in adolescents. **Journal of Clinical Hypertension**, v. 21, n. 9, p. 1343–1349, 2019.
10. FIUZA-LUCES, C. et al. **Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors**. **Nature Reviews Cardiology** Nature Publishing Group, , 1 dez. 2018.
11. GLUVIC, Z. M. et al. Regulation of nitric oxide production in hypothyroidism. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 124, n. December 2019, 2020.
12. GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. Redox-related biomarkers in physical exercise. **Redox Biology**, v. 42, 1 jun. 2021.
13. GREEN, D. J.; SMITH, K. J. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 4, 1 abr. 2018.
14. GUIMARAES, D. A.; BATISTA, R. I. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitrate and nitrite-based therapy to attenuate cardiovascular remodelling in arterial hypertension. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 128, n. 1, p. 9–17, 2021.
15. HASEGAWA, N. et al. Effects of Different Exercise Modes on Arterial Stiffness and Nitric Oxide Synthesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 50, n. 6, p. 1177–1185, 1 jun. 2018.
16. JAMES, G. D.; GERBER, L. M. Measuring arterial blood pressure in humans: Auscultatory and automatic measurement techniques for human biological field studies. **American Journal of Human Biology**, v. 30, n. 1, 2018.
17. JI, C. et al. Estimated pulse wave velocity and cardiovascular events in Chinese. **International Journal of Cardiology: Hypertension**, v. 7, n. November, p. 100063, 2020.

18. JORDÃO, C. P. et al. Aerobic swim training restores aortic endothelial function by decreasing superoxide levels in spontaneously hypertensive rats. **Clinics**, v. 72, n. 5, p. 310–316, 2017.
19. KIANI, A. K. et al. **Dietary supplements for improving nitric-oxide synthesis. Journal of preventive medicine and hygiene**NLM (Medline), , 1 jun. 2022.
20. KORSAGER LARSEN, M.; MATCHKOV, V. V. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. **Medicina (Lithuania)**, v. 52, n. 1, p. 19–27, 2016.
21. KRESNAJATI, S. et al. Changes in Arterial Stiffness in Response to Various Types of Exercise Modalities: A Narrative Review on Physiological and Endothelial Senescence Perspectives. **Cells**, v. 11, n. 22, p. 3544, 9 nov. 2022.
22. LACOLLEY, P. et al. Vascular smooth muscle cells and arterial stiffening: Relevance in development, aging, and disease. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 4, p. 1555–1617, 2017.
23. LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P. Arterial Stiffness and Hypertension in the Elderly. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, n. October, p. 1–13, 2020.
24. LEBLANC, C.; STRONG, H. R.; TABRIZCHI, R. Evaluation of different metrics as an index for the assessment of arterial stiffness. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 390–397, 2018.
25. LI, L. et al. Effects of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on blood pressure in patients with hypertension: A meta-analysis. **Medicine**, v. 101, n. 50, p. e32246, 16 dez. 2022.
26. LIN, Y. Y.; LEE, S. DA. Cardiovascular benefits of exercise training in postmenopausal hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2018.
27. LINDESAY, G. et al. Age and hypertension strongly induce aortic stiffening in rats at basal and matched blood pressure levels. **Physiological Reports**, v. 4, n. 10, p. 1–9, 2016.

28. LING, W. C. et al. Chronic administration of sodium nitrite prevents hypertension and protects arterial endothelial function by reducing oxidative stress in angiotensin II-infused mice. **Vascular Pharmacology**, v. 102, p. 11–20, 2018.
29. LING, W. C.; MUSTAFA, M. R.; MURUGAN, D. D. **Therapeutic Implications of Nitrite in Hypertension**. [s.l: s.n.]. v. 75
30. MARKMAN, B. et al. Conselho De Normatizações, Diretrizes HAS. 2021.
31. MÖLLER, M. N. et al. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 40, p. 14776–14802, 2019.
32. MÜNZEL, T.; DAIBER, A. Inorganic nitrite and nitrate in cardiovascular therapy: A better alternative to organic nitrates as nitric oxide donors? **Vascular Pharmacology**, v. 102, p. 1–10, 2018.
33. NETO-NEVES, E. M. et al. Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 134, n. January, p. 40–50, 2019.
34. PAULA, S. M. et al. Molecular Pathways Involved in Aerobic Exercise Training Enhance Vascular Relaxation. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 52, n. 10, p. 2117–2126, 2020.
35. PEDRALLI, M. L. et al. Different exercise training modalities produce similar endothelial function improvements in individuals with prehypertension or hypertension: a randomized clinical trial Exercise, endothelium and blood pressure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
36. PERUMAREDDI, P. Prevention of Hypertension Related to Cardiovascular Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 46, n. 1, p. 27–39, 2019.
37. PIGNATELLI, P. et al. How periodontal disease and presence of nitric oxide reducing oral bacteria can affect blood pressure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–14, 2020.

38. PINHEIRO, L. C. et al. A comprehensive time course study of tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, n. February, p. 43–51, 2020.
39. PINHEIRO, L. C. et al. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. **Redox Biology**, v. 38, p. 101769, 2021.
40. PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; CASTRO, M. M. The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 5, p. 543–556, 2017.
41. POWERS, S. K. et al. **Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?** **Journal of Sport and Health Science** Elsevier B.V., , 1 set. 2020.
42. POWERS, S. K.; RADAK, Z.; JI, L. L. **Exercise-induced oxidative stress: past, present and future.** **Journal of Physiology** Blackwell Publishing Ltd, , 15 set. 2016.
43. RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 2018.
44. RIZZI, E. et al. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, p. 234–243, 2019.
45. RODRIGUES, J. A. et al. Physical exercise and regulation of intracellular calcium in cardiomyocytes of hypertensive rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 2, p. 172–179, 1 ago. 2018.
46. SANCHES-LOPES, J. M. et al. Consistent gastric pH-dependent effects of suppressors of gastric acid secretion on the antihypertensive responses to oral nitrite. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, n. December 2019, p. 113940, 2020.
47. SHIMOJO, G. L. et al. Combined aerobic and resistance exercise training improve hypertension associated with menopause. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. OCT, 29 out. 2018.

48. SIASOS, G. et al. Acute effects of different types of aerobic exercise on endothelial function and arterial stiffness. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 23, n. 14, p. 1565–1572, 1 set. 2016.
49. THIRUPATHI, A.; PINHO, R. A.; CHANG, Y. Z. **Physical exercise: An inducer of positive oxidative stress in skeletal muscle aging**. *Life Sciences* Elsevier Inc., , 1 jul. 2020.
50. TIAN, D.; MENG, J. Exercise for prevention and relief of cardiovascular disease: Prognoses, mechanisms, and approaches. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, n. Mi, 2019.
51. VISCHER, A. S.; BURKARD, T. Principles of blood pressure measurement – current techniques, office vs ambulatory blood pressure measurement. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 956, p. 85–96, 2017.
52. WANG, F. et al. **Effects of Exercise-Induced ROS on the Pathophysiological Functions of Skeletal Muscle**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Hindawi Limited, , 2021.
53. WANG, H. et al. Acute effects of continuous and interval low-intensity exercise on arterial stiffness in healthy young men. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 7, p. 1385–1392, 2014.
54. YANO, Y. et al. On-Treatment Blood Pressure and Cardiovascular Outcomes in Older Adults with Isolated Systolic Hypertension. **Hypertension**, v. 69, n. 2, p. 220–227, 2017.
55. ZHANG, G. et al. Berberine reduces endothelial injury and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 42, n.
56. ZHANG, M. et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 42, p. 18121–18126, 2010.



57. ZHANG, G. et al. Berberine reduces endothelial injury and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 42, n. 3, p. 257–265, 2 abr. 2020

## ANEXO 1 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Bauru



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do exercício físico e da suplementação de nitrito no controle cardiovascular de ratos idosos", registrada com o nº 281/2020 Vol. 1, sob a responsabilidade do Prof. Dr. ANDERSON SARANZ ZAGO - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS, CAMPUS DE BAURU, em reunião de 27/05/2020.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	De 01/07/2020 a 30/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	96
Peso/Idade	200-250g/45 dias
Sexo	Macho
Origem	Centro de Pesquisa e Produção de Animais da UNESP-Botucatu

  
 Profª Associada Sandra Lia do Amaral Cardoso  
 Coordenadora da CEUA