UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MÔNICA VOLINO GONÇALVES DE SOUZA

Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes

Rio de Janeiro
2018

MÔNICA VOLINO GONÇALVES DE SOUZA

Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Orientador: Thiago da Silveira Alvares

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pois sem Ele nada seria. Agradeço por todas as bênçãos que me concedeu e por ter colocado tantas pessoas especiais ao meu lado durante essa etapa.

Agradeço aos meus pais, **Rafael e Dirlei**, pelo apoio e incentivo durante todo meus estudos. Ao meu pai agradeço as inúmeras caronas nas madrugadas para que eu conseguisse chegar à Macaé. À minha mãe por todo zelo e por tornar essa caminhada menos cansativa. Obrigada pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, **Rafael e Diego**, por sempre me incentivarem e por todos os momentos de descontração e parceria.

Ao meu noivo, **Gustavo**, meu maior incentivador e meu maior exemplo dentro da academia. Obrigada por sempre estar ao meu lado e por nunca ter me deixado desistir. Por tantas vezes abdicar de suas atividades para me ajudar. Te amo!

Ao meu orientador, **Thiago Alvares**, sou imensamente grata por todas as oportunidades que me deu. Por sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas e questionamentos. Este período que estive sob sua orientação foi essencial para meu crescimento acadêmico.

Aos meus colegas que fizeram e fazem parte do Grupo de Pesquisa em Nutrição e Metabolismo do Exercício, **Luiz e Elisaldo**, por auxiliar no transporte das voluntárias do estudo. Ao **Otávio** nosso "HPLIC**", Elisa e Ana Paula** pelas risadas e lanches da tarde.

Às minhas queridas **voluntárias** que disponibilizaram um pouco do seu tempo para participar do estudo.

Às queridas **Marinete e Simone** que por tantas vezes escutaram minhas angústias e sempre estavam com palavras de carinho para ajudar. A **Regina Finger** por ser um grande exemplo de pessoa e profissional, obrigada por todo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

(...) Todas as coisas cooperam para o
bem daqueles que amam a Deus (...)
Romanos 8:28

APRESENTAÇÃO

A alteração da função do endotélio vascular está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e durante o período da gestação está relacionada com desfechos adversos para a mãe e o concepto. Tem sido amplamente investigado o efeito da ingestão de compostos que apresentam propriedades vasoativas sobre os parâmetros de função endotelial em diversas populações. Evidências científicas mostram o efeito positivo da ingestão do suco de beterraba rico em nitrato, um precursor do óxido nítrico, sobre a função endotelial. Contudo, não há estudos investigando este efeito em gestantes.

O Grupo de Pesquisa em Nutrição e Metabolismo do Exercício (GPNutMEx) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, do qual participo desde 2016, em uma de suas linhas de pesquisa desenvolve estudos que avaliam o efeito da ingestão do suco de beterraba sobre parâmetros de função endotelial macro e microvascular em diversas populações, como indivíduos com fatores de risco para doenças cardiovasculares e atletas.

O presente estudo foi desenvolvido com objetivo de ampliar as evidências científicas do efeito da ingestão do suco de beterraba sobre a função endotelial em outras populações. Unindo-se a este objetivo estava o meu interesse em trabalhar com gestantes, um grupo que me encantei durante a graduação. A presente dissertação intitulada "Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes" tem como objetivo avaliar o efeito da ingestão de uma única dose de suco de beterraba sobre os parâmetros de função endotelial em gestantes. A dissertação foi dividiam em dez capítulos além do manuscrito que foi submetido para publicação na revista British Journal ou Nutrition.

Durante a estudo fui responsável pelo recrutamento das voluntárias, recepção em nosso laboratório, análise de nitrato na urina e análise dos parâmetros bioquímicos, elaboração de orientações nutricionais, aferição da pressão arterial, análise dos parâmetros de oxigenação tecidual, análise e interpretação de todos os dados. A análise de função endotelial foi realizada pelo doutorando Gustavo Vieira de Oliveira, que apresenta ampla experiência nesta análise.

A realização de estudo contou com a experiência e a estrutura de três laboratórios do Grupo de Pesquisa em Nutrição e Metabolismo do Exercício localizados no Polo Ajuda da Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Macaé. Também contou com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) para

concessão de bolsa de mestrado e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

FICHA CATALOGRÁFICA

MÔNICA VOLINO GONÇALVES DE SOUZA

Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em

_____

Prof. Dr. Thiago da Silveira Alvares (Orientador), Doutor em Ciências de Alimentos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª. Drª. Anna Paola Trindade Rocha Pierucci, Doutora em Ciências de Alimentos
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Profª. Drª. Cláudia Saunders, Doutora em Saúde Pública
Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior, Doutor em Medicina Veterinária
Universidade Federal Fluminense

Resumo

SOUZA, Mônica Volino Gonçalves de. Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Nutrição (Mestrado em Nutrição Humana) - Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O consumo de suco de beterraba (SB) tem sido associado com a melhora da saúde cardiovascular, devido ao aumento da bioconversão do nitrato a óxido nítrico (NO). No presente estudo foi avaliado o efeito do consumo de SB sobre a função endotelial macrovascular através da dilatação fluxo mediada (FMD) e sobre os parâmetros de saturação de oxigênio muscular (StO_2), em gestantes adultas. No período de outubro de 2016 até maio de 2017 foi realizado o estudo de intervenção agudo, randomizado, do tipo *cross-over,* duplo cego e controlado por placebo. Doze gestantes receberam uma única dose (140 mL) de SB ou placebo (PLA). A técnica da FMD foi utilizada para avaliar a função endotelial macrovascular e a espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) foi utilizada para avaliar os parâmetros de StO_2 durante os períodos de oclusão arterial e reperfusão, os quais foram realizados antes da intervenção nutricional (PRE) e 120 (T120) e 140 minutos (T14) após a intervenção nutricional, respectivamente. Nitrato urinário foi coletado antes (T0) e 150 minutos (T150) após a intervenção nutricional. Foi observado que em T150 houve um aumento do nitrato urinário, após o consumo de SB, comparado a T0 (P = 0.000) e PLA (P=0.000). A FMD aumentou após o consumo de SB quando comparado a PRE (P = 0.000) e PLA (P = 0.000), enquanto que não houve melhora na FMD após a ingestão de PLA comparado a PRE (P = 1.000). Nos parâmetros de StO_2, não foi observada diferença após a ingestão de SB comparado a PRE e PLA. Os dados sugerem que a ingestão de uma única dose de 140 mL de SB melhora a função endotelial macrovascular, porém não os parâmetros de StO_2 em gestantes.

Abstract

SOUZA, Mônica Volino Gonçalves de. Effect of beetroot juice consumption in macrovascular endothelial function and tissue oxygen saturation in pregnant. Rio de Janeiro, 2018. Dissertation (Master in Human Nutrition) - Institute of Nutrition Josué de Castro, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Beetroot juice (BJ) consumption has been associated with improved cardiovascular health due increase in nitric oxide (NO) bioconversion. The present study evaluates the effect of BJ consumption on macrovascular endothelial function by flow-mediated dilation (FMD) and muscle O_2 saturation parameters (StO_2) in pregnant women within a randomized, crossover, double-blind design. The study was study was conducted from October 2016 to May 2017. Twelve pregnant women consumed a single dose (140 mL) of BJ or PLA. Flow-mediated dilation (FMD) technique was used to evaluate macrovascular endothelial function and near-infrared spectroscopy (NIRS) was used to evaluate muscle StO_2 parameters during occlusion and reperfusion phase, which were taken at PRE nutritional intervention and 120 and 140 min after nutritional intervention, respectively. Nitrate urinary was drawn before (T0) and 150 min after nutritional intervention. After BJ consumption, nitrate urinary increase compared to T0 (P = 0.000) and PLA intervention (P = 0.001). FMD improved after BJ consumption when compared to PRE (P = 0.000) and to PLA (P = 0.000), but whereas there was no improvement in FMD when comparing PLA to PRE (P = 1.000). In StO_2 parameters, a difference was not observed after BJ consumption compared to PRE and PLA intervention. The data demonstrates that a single dose of 140 mL of BJ consumption improves macrovascular endothelial function, but not StO_2 parameters.

Sumário

1. Introdução 12
2. Revisão da literatura
   2.1 Óxido nítrico e função endotelial 14
   2.2 Métodos avaliativos da função endotelial 15
   2.3 Vias de produção de NO 16
   2.4 Fontes de nitrato dietético 17
   2.5 Ação do nitrato proveniente da beterraba sobre a saúde vascular
      2.5.1 Função endotelial 19
      2.5.2 Parâmetros de oxigenação tecidual 22
      2.5.3 Pressão arterial 24
      2.5.4 Rigidez arterial 24
   2.6 Redução da biodisponibilidade de NO em gestantes 25
3. Justificativa 27
4. Objetivos
   4.1 Geral 28
   4.2 Específicos 28
5. Métodos
   5.1 Voluntárias 29
   5.2 Modelo experimental 31
   5.3 Intervenção nutricional 31
   5.4 Análise de nitrato urinário 32
   5.5 Função endotelial 33
   5.6 Parâmetros de oxigenação tecidual 33
   5.7 Análise estatística 35
6. Resultados 36
7. Discussão 40
8. Considerações finais 45
9. Artigo em submissão 44
10. Referências 45
11. Anexos 52

Lista de Figuras

Figuras	**Página**
Figura 1: Via do nitrato-nitrito-NO.	17
Figura 2. Figura 2. Fluxograma do progresso das fases do estudo.	30
Figura 3: Desenho experimental - Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes.	31
Figura 4: Parâmetros do NIRS.	34
Figura 5: Valores de média da FMD em PRE e após a ingestão de PLA e SB.	37
Figura 6: Parâmetros de StO_2 após a ingestão de PLA e SB.	39

Lista de tabela

Tabelas	**Página**
Tabela 1: Características basais: demográficas, bioquímicas e clínicas	36
Tabela 2: Parâmetros de função endotelial macrovascular em PRE e após a ingestão de PLA e SB.	38
Tabela 3: Parâmetros de StO_2 em PRE e após a ingestão de PLA e SB.	39

Lista de siglas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
BH_4	Tetrahidropiopterina
DB	Diâmetro basal
DP	Diâmetro de pico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FMD	Dilatação fluxo mediada
GB	Gel de beterraba
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
HHb	Hemoglobina desoxigenada
HPLC	Cromatrografia líquida de alta eficiência
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NHA	n^G – hidroxi-L-arginina
NIRS	Espectroscopia no infravermelho próximo
Nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
O_2	Oxigênio
O_2Hb	Hemoglobina oxigenada
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PE	Pré-eclâmpsia
pH	Potencial hidrogeniônico
RCIU	Restrição do crescimento fetal intrauterino
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SB	Suco de beterraba
StO_2	Saturação de oxigênio tecidual
$StO_{2\ base}$	StO_2 baseline
$StO_{2\ max}$	StO_2 máxima
$StO_{2\ min}$	StO_2 mínima
$StO_{2\ slope_1}$	Taxa de desaturação
$StO_{2\ slope_2}$	Taxa de resaturação
$StO_{2\ tmax}$	Tempo até StO_2 máxima
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular -1
VSMC's	células do músculo liso vascular

1. Introdução

A beterraba ganhou atenção da comunidade científica, devido às suas propriedades na saúde cardiovascular. Estudos têm avaliado os efeitos benéficos da beterraba sobre doenças cardiovasculares e tem sido observado melhora da função macro e microvascular (Oliveira et al., 2016; Velmurugan et al., 2016; Bakker et al., 2015; Kapil et al., 2015; Masschelein et al., 2012; Bailey et al., 2009; Webb et al., 2008). O efeito da beterraba sobre a saúde cardiovascular é explicado pela presença do nitrato em sua composição. O nitrato pode ser convertido a nitrito na cavidade oral pela ação de bactérias anaeróbicas facultativas que expressam a enzima nitrato redutase. No ambiente ácido do estômago e com baixa disponibilidade de oxigênio o nitrito é rapidamente convertido a óxido nítrico (NO) (Bakker et al., 2015; Lundberg et al., 2015; Bailey et al., 2009; Lundberg et al., 2009).

Os efeitos do consumo do suco de beterraba (SB) na função endotelial macrovascular têm sido avaliados e estudos têm mostrado melhora da dilatação fluxo mediada (FMD). Idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares apresentaram melhora da FMD após a ingestão de uma única dose de um gel a base de beterraba (Oliveira et al., 2017). Indivíduos saudáveis apresentaram melhora da FMD após a ingestão de 500 mL de SB (Webb et al., 2008). Hipertensos tratados e não tratados com medicamento apresentaram melhora da FMD após vinte e oito (28) dias de ingestão de 250 mL SB (Kapil et al., 2015) e indivíduos hipercolesterolêmicos também apresentaram melhora da FMD após 6 semanas de consumo de 250 mL de SB (Velmurugan et al., 2016).

Os efeitos do consumo de SB a nível microvascular também têm sido avaliado através da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS), uma tecnologia que observa as mudanças na saturação de oxigênio tecidual (StO_2), avaliando a extração de oxigênio (capacidade oxidativa) e função microvascular durante o período de oclusão arterial e reperfusão (Masschelein et al., 2012; Bailey et al., 2009). Em indivíduos saudáveis, seis (6) dias de ingestão de 500mL de SB promoveu melhora da oxigenação tecidual durante exercício submáximo e máximo em hipóxia (Masschelein et al., 2012). Também, em jovens saudáveis, seis (6) dias de consumo de 70 mL de SB promoveu melhora dos parâmetros de oxigenação durante exercício (Bailey et al., 2015).

Apesar dessas evidências demonstrando efeito do consumo de SB na função endotelial e parâmetros de oxigenação, nenhum estudo em gestante foi realizado até o momento. Durante a gestação, a redução dos valores de FMD está associada com síndromes hipertensivas, enquanto que, o aumento dos valores de FMD reduz o risco de doenças

cardiovasculares (Green et al., 2011). Além disso, a função microvascular preservada durante a gestação está associada à adequada oxigenação tecidual. Condições com baixa disponibilidade de oxigênio podem comprometer a oferta de oxigênio para o feto e acarretar em restrição do crescimento fetal intrauterino (RCIU) (Savvidou et al., 2003). Alternativas nutricionais são importantes para manutenção da saúde cardiovascular e reduzir o risco de complicações durante a gestação e desenvolvimento fetal.

Dessa forma, o presente estudo investigou se a ingestão de uma única dose de SB pode aumentar os valores de FMD e melhorar os parâmetros de oxigenação durante a gestação. A hipótese do estudo é de que uma única dose de SB pode aumentar a bioconversão do nitrato a nitrito e, posteriormente, a NO e, consequentemente, promover aumento do valor da FMD e parâmetros de oxigenação em gestantes.

2. Revisão de literatura

2.1 Óxido nítrico e função endotelial

O endotélio vascular é uma fina monocamada de células localizada na superfície interna dos vasos sanguíneos (Loh et al., 2018). As células endoteliais participam do controle da permeabilidade vascular, do fluxo sanguíneo, tônus vascular, angiogênese e troca de fluidos e moléculas entre o sangue e os tecidos circundantes, e são responsáveis pela secreção de diversas moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (NO) (Donato et al., 2015).

A função do endotélio vascular é regulada pelo equilíbrio entre fatores pró e antioxidantes, vasodilatadores e vasoconstritores, moléculas pró e anti-inflamatórias e sinais pró e anti-trombóticos (Faulx et al., 2003). O desequilíbrio entre estes fatores acarreta na disfunção endotelial, que é caracterizado pela diminuição da biodisponibilidade do NO (Tousoulis et al., 2014; Shao et al., 2014). Diversos fatores podem reduzir a produção do NO, entre eles está redução da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), redução dos substratos e cofatores da eNOS e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Shao et al., 2014; Faulx et al., 2003).

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel que desempenha importantes funções, como a regulação do tônus vascular, por promover o relaxamento do músculo liso esquelético nos vasos sanguíneos, inibição da agregação plaquetária, inibição da proliferação das células musculares lisas, efeito anti-inflamatório por diminuir a permeabilidade endotelial e efeito antioxidante (Tousoulis et al., 2012).

A participação do NO na regulação do tônus vascular se dá pela ativação do monofosfato guanosina cíclico (GMPc). Após a liberação no endotélio, o NO rapidamente se difunde para a camada de músculo liso esquelético dos vasos sanguíneos e se liga ao grupamento heme da guanilatociclase, tornando-a ativa. A guanilatociclase ativada promove aumento do GMPc, que nas células endoteliais ativa a quinase dependente de GMP e, assim, diminui a concentração intracelular de cálcio e promove o relaxamento do músculo (Tousoulis et al., 2012).

Além da participação na regulação do tônus vascular, o NO também atua como agente anti-inflamatório. O processo inflamatório promove aumento da permeabilidade endotelial e da adesão leucocitária, acarretando na migração transendotelial de leucócitos para o local da inflamação (Su, 2015). Mediadores inflamatórios como bradicinina e histamina promovem a liberação do NO que reduz a expressão de moléculas de adesão e, assim, inibe a adesão e a migração leucocitária (Tousoulis et al., 2012).

O NO também apresenta efeito inibidor da agregação e da reatividade plaquetária, um importante evento associado ao desenvolvimento da aterosclerose e trombose (Velmurugan et al., 2013; Webb et al., 2008). Também é observado efeito do NO na inibição da proliferação de diferentes tipos celulares, como nas células do músculo liso vascular (VSMCs) (Napoli et al., 2013; Chen et al., 2011). Devido às diversas funções do NO, sua biodisponibilidade é essencial para manutenção da função vascular.

2.2 Métodos avaliativos da função endotelial

A função endotelial pode ser avaliada através de marcadores biológicos, como a dimetilarginina assimétrica (ADMA), homocisteína, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e E-selectina. A ADMA é um produto natural do metabolismo de proteínas, porém encontra-se elevado quando há aumento do estresse oxidativo (Jamwal e Sharma, 2018). Por ser um análogo da L-arginina, atua negativamente na produção de NO e, assim, pode levar a disfunção endotelial (Porto et al., 2014).

Uma meta-análise realizada por Wang et al. (2018) mostrou que em indivíduos com doença renal a ADMA circulante está positivamente correlacionada com a espessura da camada íntima-média da carótida, podendo ser utilizado como um preditor de aterosclerose nessa população. Zheng et al. (2016) observaram que gestantes com pré-eclâmpsia (PE) apresentavam maior concentração de ADMA quando comparado com gestantes normotensas.

A homocisteína é um aminoácido derivado da metionina. O aumento de sua concentração promove redução da expressão de eNOS, causando a disfunção endotelial (Zhao et al., 2017). Hu et al. (2013) observaram que indivíduos com doença arterial coronariana apresentavam maior concentração de homocisteína quando comparado com indivíduos saudáveis.

A pletismografia de oclusão venosa é uma técnica utilizada em estudos clínicos para avaliar a função endotelial. Junqueira et al. (2018) observaram que indivíduos hipertensos apresentavam menor fluxo sanguíneo e maior resistência vascular quando comparado com indivíduos normotensos durante pletismografia de oclusão venosa. Dow et al. (2016) observaram que a presença de síndrome metabólica diminui a vasodilatação dependente do endotélio quando avaliado pela pletismografia de oclusão vascular.

A dilatação fluxo mediada (FMD) da artéria braquial é uma técnica que permite avaliar a função endotelial macrovascular. A FMD avalia a dilatação da artéria braquial que é

dependente da liberação de NO durante a hiperemia reativa. Esta técnica tornou-se atrativa por ser uma avaliação não-invasiva e por fornecer informações sobre prognóstico de doenças cardiovasculares (Green et al., 2011). Estudos têm observado que indivíduos com fatores de risco para doenças cardiovasculares apresentam baixos valores de FMD (Schroeder et al., 1999). Ghiadoni et al. (2008) mostraram que indivíduos com três (3) ou mais fatores de risco apresentaram valores baixos de FMD quando comparados com indivíduos saudáveis.

Nos vasos de pequeno calibre, a técnica da espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS) é capaz de mensurar, de forma não invasiva, as mudanças da concentração de hemoglobina oxigenada e desoxigenada, em repouso e durante exercício ou período de oclusão arterial. Gayda et al. (2015) mostraram que indivíduos com dois (2) ou mais fatores de risco para doenças cardiovasculares apresentavam disfunção microvascular quando avaliada pelo NIRS.

2.3 Vias de produção do NO

O NO pode ser produzido por meio de duas vias, a clássica da L-arginina e a via de bioconversão do nitrato e nitrito (Gkaliagkousi et al., 2015; Lundberg et al., 2008). A via clássica é dependente de cofatores como o oxigênio (O_2), tetrahidrobiopterina (BH_4), fosfato de dinucleotido de nicotinamida e adenina (NADPH) e ação enzimática da família óxido nítrico sintase (NOS).

A família NOS apresenta três isoformas: a induzível (iNOS), neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS). Nas células endoteliais após a liberação de estímulos mecânicos (*shear stress*) ou químicos (liberação de bradicinina e histamina) a L-arginina sofre ação da eNOS e é convertida a N^G-hidroxi-L-arginina (NHA), que por sua vez é convertido em L-citrulina e NO (Dusse et al., 2003). O BH_4 é uma importante cofator nessas reações metabólicas, pois estabiliza a eNOS e permite a adequada oxidação da L-arginina a NO. Redução dos níveis de BH_4 está associada a uma variedade de eventos clínicos, como diabetes *mellitus*, hipertensão, aterosclerose e hiperglicemia (Leiva et al., 2016).

A produção de NO através da bioconversão de nitrato e nitrito é uma via que não depende da presença de O_2 e dos demais cofatores, sendo uma importante contribuição para produção de NO em ambientes de hipóxia. Inicialmente acreditava-se que o nitrato e nitrito eram apenas produtos do metabolismo do NO, porém foi descoberto que estes compostos em condições favoráveis, como baixo pH e baixa disponibilidade de O_2, constituem uma via para produção do NO (Ahluwalia et al. 2016).

Após a ingestão, o nitrato é rapidamente absorvido no intestino delgado e uma parte é excretada pelos rins. Após alcançar a circulação, 25% do nitrato é captado pelas glândulas salivares através da circulação enterosalivar. Ao retornar a cavidade oral, bactérias facultativas que estão presentes na superfície da língua utilizam o nitrato como aceptor de elétrons, reduzindo o nitrato a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase. No estômago, devido ao ambiente ácido, o nitrito é convertido a ácido nitroso que em seguida é transformado em NO e outros compostos nitrosos. O nitrito remanescente pode alcançar a circulação e em condições de hipóxia pode ser convertido a NO (Lundberg et al. 2015) (Figura 1).

Foi observado que existem fatores que podem limitar a via nitrato-nitrito-NO. Uma delas é a redução da conversão do nitrato a nitrito na cavidade oral, após o uso de antisséptico bucal. Govoni et al. (2008) observaram que houve redução da concentração do nitrito salivar quando 10 mL de antisséptico bucal foram utilizados 15 minutos antes da ingestão de nitrato de sódio. Outro fator limitante é a redução da acidez gástrica provocada pela utilização de inibidores da bomba de próton. Montenegro et al. (2017) mostraram que o uso destes fármacos atenuam a diminuição da pressão arterial que é observada após o consumo de nitrito de sódio.

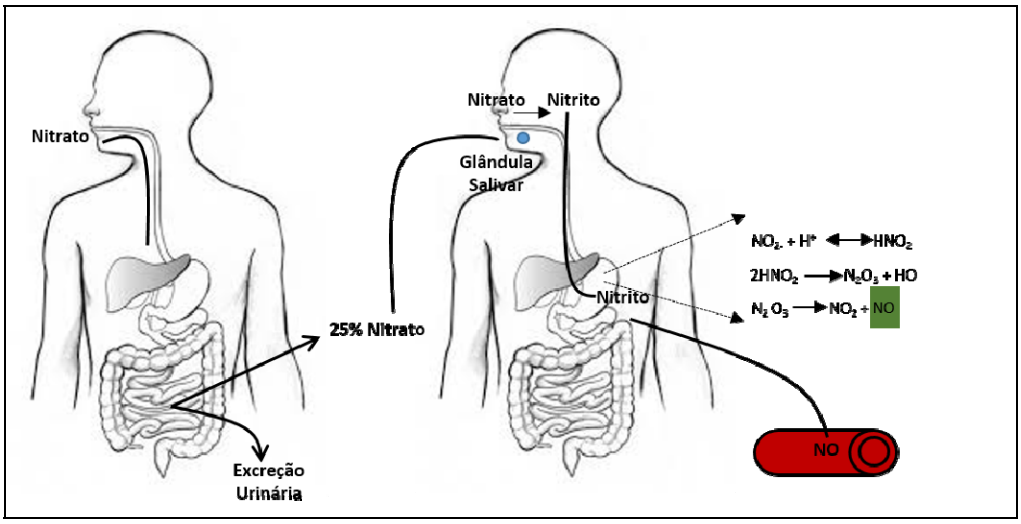

Figura 1. Via nitrato-nitrito-NO

2.4 Fontes de nitrato dietético

O nitrato é um íon que está presente em diversos vegetais. Cerca de 85% do nitrato dietético é proveniente destes alimentos (Lidder e Webb, 2013). A concentração de nitrato nos vegetais pode ser influenciada por fatores ambientais (temperatura, umidade, conteúdo de

água) e genéticos (Santamaria, 2006). Além disso, a concentração também varia de acordo com a anatomia da planta, sendo as folhas a parte com maior concentração de nitrato seguido da haste e da raiz (Machha e Schechter, 2012).

Os vegetais que apresentam maior concentração de nitrato são: beterraba (*Beta vulgaris L.*), aipo (*Apium graveolens*), agrião (*Nasturtium officinale*), espinafre (*Spinacia oleracea*) e rúcula (*Eruca sativa*) (Hord et al., 2009). Devido esta característica, a beterraba ganhou atenção da comunidade científica e o efeito da sua ingestão sobre saúde vascular tem sido avaliada (Oliveira et al., 2017; Kapil et al., 2015; Webb et al., 2008; Hobbs et al., 2013).

A beterraba é um vegetal cultivado em todo o mundo e é consumida regularmente como parte da dieta normal (Clifford et al., 2015). Além da sua alta concentração de nitrato, também apresenta antioxidantes e fibra dietética em sua composição (Morgado et al., 2016). Diversas formas de preparo da beterraba têm sido utilizadas como meios alternativos de consumo desse vegetal (Oliveira et al., 2016, Hobb et al., 2013). Vasconcellos et al. (2016) ao analisar o suco, chips, pó, e beterraba cozida observaram que o teor de nitrato era aproximadamente 12 mg/Kg; 2 mg/kg; 1,5 mg/Kg; 1,5 mg/Kg, respectivamente.

Embora o SB seja uma forma prática de consumo de beterraba, outros estudos têm buscado elaborar formas alternativas de consumo da beterraba. Recente estudo do nosso grupo de pesquisa elaborou um gel a base de beterraba (GB), tendo em vista que o alimento na forma de gel é mais concentrado, conveniente para armazenamento e consumo (Morgado et al., 2016). A aceitabilidade do gel foi similar quando comparado com o SB. Além disso, Hobbs et al. (2013) utilizaram o pão a base de beterraba como fonte de nitrato dietético para observar alterações na função endotelial e pressão arterial de jovens.

Além da beterraba, estudos também têm utilizado outros vegetais como fonte de nitrato, como o gel de acelga e ruibarbo (*Rheum rhabarbaum*) (McIlvenna et al., 2016; Muggeridge et al., 2015) e extrato de espinafre (*Amaranthus tricolor*) (Haum et al., 2016) (Quadro 1).

Quadro 1. Alimentos fonte de nitrato e sua concentração.

Alimento	Concentração de nitrato	Referência
SB	0,19 mmol/L	Vasconcellos et al., 2016
Chips de beterraba	0,03 mmol/L	Vasconcellos et al., 2016
Pó de beterraba	0,02 mmol/L	Vasconcellos et al., 2016
Beterraba cozida	0,02 mmol/L	Vasconcellos et al., 2016
Pão de beterraba	0,08 mmol/L	Hobbs et al., 2013
GB	1,93 mmol/L	Morgado et al., 2016
Gel de acelga e ruibarbo	66 mmol/L	Muggeridge et al., 2015
Extrato de espinafre	1,45 mmol/L	Haum et al. 2016

SB, suco de beterraba; GB, gel de beterraba

2.5 Ação do nitrato proveniente da beterraba sobre a função vascular

2.5.1 Função endotelial

A função endotelial preservada é essencial para manutenção da saúde vascular. Estudos têm observado que indivíduos com baixos valores de FMD apresentam maior risco para doenças cardiovasculares, enquanto que o aumento de 1% na FMD reduz este risco em 9% (Green et al., 2011). Além disso, a FMD tem sido uma técnica vastamente utilizada em estudos que buscaram avaliar os efeitos da ingestão do nitrato dietético sobre a função endotelial, uma vez que perante protocolo adequado, a FMD fornece um índice de produção do NO (Green et al., 2011). Sendo assim, diversos estudos mostram melhora da FMD após a ingestão do SB e do GB rico em nitrato (Oliveira et al., 2016; Bakker et al., 2015; Kapil et al., 2015; Velmurugan et al., 2016).

Oliveira et al. (2016) observaram melhora da FMD em idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares após a ingestão de 100 g de GB contendo aproximadamente 12 mmol de nitrato. Bakker et al. (2015) observaram aumento da FMD em indivíduos saudáveis em altas altitudes após a ingestão de 70 mL de SB contendo 5 mmol de nitrato. Joris e Mensink (2013) observaram que a ingestão de 140 mL de SB contendo 500 mg de nitrato atenuou a diminuição da FMD causada pela ingestão de uma refeição contendo aproximadamente 55g de lipídeos.

Ao observar o efeito crônico da ingestão do SB sobre a função endotelial macrovascular Kapil et al. (2015) mostraram aumento de aproximadamente 20% na FMD de hipertensos em tratamento medicamentosos e sem medicamento após a ingestão de 250 mL de SB durante 2 semanas. Velmurugan et al. (2016) observaram aumento de aproximadamente 24% na FMD de hipercolesterolêmicos sem tratamento medicamentoso após a ingestão de 250 mL de SB durante 6 semanas. Asgary et al. (2016) mostraram aumento da FMD em adultos saudáveis após a ingestão de 250 mL de SB e 250 g de beterraba cozida durante 2 semanas. Lee et al. (2015) observaram aumento da FMD em indivíduos saudáveis após a ingestão de 70 mL de SB durante 15 dias. Apesar destas evidências, Gilchrist et al. (2013) não observaram melhora da FMD em indivíduos com diabetes tipo 2 após a ingestão de 250 mL de suco durante 2 semanas (Quadro 2).

Em suma, a ingestão de SB promove melhora da FMD em indivíduos com fatores de risco para doenças cardiovasculares e em saudáveis, exceto em diabéticos tipo 2. Estes efeitos podem ser observados com uma ingestão única ou prolongada do suco. Contudo, não há evidências dos benefícios da ingestão de SB sobre a FMD de gestantes.

Quadro 2. Estudos clínicos que investigaram o efeito da ingestão da beterraba sobre FMD.					
Ingestão	**Forma de preparo**	**Concentração de nitrato**	**População**	**Efeito sobre FMD**	**Referências**
Única	SB	5 mmol	Jovens saudáveis	Aumentou	Bakker et al., 2015
Única	GB	12 mmol	Idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares	Aumentou	Oliveira et al., 2017
Única	SB	500 mg	Sobrepesos e obesos	Aumentou	Joris e Mensink, 2013
2 semanas	SB	6,4 mmol	Hipertensos tratados e não tratados	Aumentou	Kapil et al., 2015
6 semanas	SB	6 mmol	Hipercolesterolêmicos não tratados	Aumentou	Velmurugan et al., 2016
2 semanas	SB e beterraba cozida		Jovens saudáveis	Aumentou	Asgary et al., 2016
2 semanas	SB	6,4 mmol	Adultos saudáveis	Aumentou	Lee et al., 2015
2 semanas	SB	7,5 mmol	Diabéticos tipo 2	Nenhum efeito	Gilchrist et al., 2013

SB, suco de beterraba; GB, gel de beterraba.

2.5.2 Parâmetros de oxigenação tecidual

Os parâmetros de oxigenação tecidual avaliados pelo NIRS refletem o balanço entre a oferta e o consumo de oxigênio pelo tecido durante um período de oclusão arterial/exercício e de reperfusão. Estudos clínicos têm observado o efeito do consumo do SB sobre os parâmetros de oxigenação cerebral e muscular durante o exercício (Oliveira et al., 2017; Wightman et al., 2015; Haskell et al., 2012; Papadopoulos et al., 2018).

No estudo de Wightman et al. (2015), foi observado que a ingestão de 450 mL de SB contendo 5,5 mmol de nitrato foi capaz de aumentar o fluxo sanguíneo cerebral durante teste de performance cognitiva em adultos saudáveis. No estudo de Haskell et al. (2013) realizado com jovens fisicamente ativos foi observado menores valores de hemoglobina desoxigenada cerebral durante o exercício e em repouso após a ingestão de 450 mL de SB contendo 5,5 mmol de nitrato quando comparado com placebo (Quadro 3).

Além dos parâmetros de oxigenação cerebral, estudos também avaliaram o efeito da ingestão do SB e GB sobre a oxigenação muscular. Oliveira et al. (2017) observaram que após uma única ingestão de 100g de GB houve aumento da extração de O_2 pelo músculo do antebraço. Durante o período de recuperação, houve aumento da taxa de restauração de O_2 e aumento do fluxo sanguíneo no músculo do antebraço em resposta ao exercício de preensão manual em idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares. Papadopoulos et al. (2018) observaram que após a ingestão de 500 mL de SB contendo 8 mmol de nitrato houve aumento da capacidade oxidativa e aumento do volume sanguíneo durante exercício de preensão manual, com oclusão arterial em indivíduos jovens fisicamente ativos (Quadro 3).

Ao observar o efeito da ingestão prolongada de SB, Bailey et al. (2015) observaram que o consumo de 70 mL de SB durante nove (9) dias, aumentou a oxigenação muscular durante ciclismo de alta intensidade. Horiuchi et al. (2017) observaram que a ingestão de 140 mL de SB durante quatro (4) dias suprimiu o aumento da hemoglobina desoxigenada durante o exercício de hipóxia, quando comparado ao placebo em jovens. Apesar destes efeitos benéficos nos parâmetros de oxigenação perante o exercício, Kent et al. (2018) não observaram melhora da oxigenação muscular durante o ciclismo em ambientes quentes após três (3) dias de ingestão de SB por ciclistas treinados (Quadro 3).

Em síntese, o consumo de SB apresenta efeitos benéficos nos parâmetros de oxigenação cerebral e muscular em indivíduos com fatores de risco para doenças cardiovasculares e saudáveis. Contudo, não há evidências do efeito da ingestão do SB sobre parâmetros de oxigenação muscular em gestantes.

Quadro 3. Estudos clínicos que avaliaram o efeito da ingestão de beterraba sobre parâmetros de oxigenação

Ingestão	Forma de preparo	Concentração de nitrato	População	Tecido	Efeito sobre parâmetros do NIRS	Referências
Única	GB	12 mmol	Idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares	Músculos do antebraço	Melhorou	Oliveira et al., 2017
Única	SB	5,5 mmol	Adultos saudáveis	Cerebral	Melhorou	Wightman et al., 2015
Única	SB	5,5 mmol	Jovens fisicamente ativos	Cerebral	Melhorou	Haskell et al., 2012
Única	SB	8 mmol	Adultos fisicamente ativos	Músculos do antebraço	Melhorou	Papadopoulos et al., 2018
9 dias	SB	8,4 mmol	Jovens saudáveis	Músculo vasto lateral	Melhorou	Bailey et al., 2015
4 dias	SB		Jovens fisicamente ativos	Músculo vasto lateral	Melhorou apenas durante o exercício	Horiuchi et al., 2017
3 dias	SB	6,5 mmol (2º dias) 13 mmol (3º dia)	Ciclistas treinados	Músculo vasto lateral	Nenhum efeito	Kent et al., 2018

SB, suco de beterraba; GB, gel de beterraba.

2.5.3 Pressão arterial

A hipertensão arterial foi responsável por aproximadamente 78862 óbitos de homens e mulheres de todas as idades em 2015 apenas nos Estados Unidos (Benjamin et al., 2018). A hipertensão arterial é definida como pressão arterial sistólica valores acima de 140 mmHg e diastólica acima de 90 mmHg (Poulter et al., 2015), e é considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares. Estudos têm mostrado efeito benéfico do consumo da beterraba sobre a pressão arterial (PA) (Raubenheimer et a., 2017; Webb et al., 2008).

Raubenheimer et al. (2017) observaram redução da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em indivíduos idosos, após uma única ingestão de 140 mL de SB contendo 12,9 mmol de nitrato. Webb et al. (2008) observaram redução da PAS e PAD em jovens saudáveis, após a ingestão de 250 mL de SB. Contudo, Oliveira et al. (2016) não observaram redução da pressão arterial em idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares após a ingestão de 100 g de GB.

Além do efeito agudo, diversos estudos também encontraram redução da PA com a ingestão crônica de SB (Asgary et al., 2016; Kapil et al., 2015; Jajja et al., 2014). Kapil et al. (2015) observaram redução da pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) em hipertensos tratados e não tratados após a ingestão de 250 mL de SB durante 2 semanas. Jajja et al. (2014) observaram redução da PAS e PAD em idosos após a ingestão de 70 mL de SB durante 3 semanas. Asgary et al. (2016) observaram redução da PAS e PAD em adultos após a ingestão de 250 mL de SB durante 2 semana.

2.5.4 Rigidez arterial

A rigidez arterial é caracterizada pela redução das propriedades elásticas do vaso sanguíneo (Xu et al., 2017) e é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (Bellien et al., 2010). Estudos têm mostrado que a ingestão do SB pode melhorar a rigidez arterial quando utilizados os parâmetros: índice de aumento (AI), velocidade de pulso de onda (PWV) (Hughes et al., 2016; Velmurugan et al., 2016; Kapil et al., 2015; Lara et al. 2015).

Ao avaliar o efeito da ingestão de SB sobre (AI) em adultos, Hughes et al. (2016) mostraram que 500 mL de SB contendo 9,4 mmol de nitrato promoveu melhora do AI em adultos jovens, mas não em adultos mais velhos. Oliveira et al. (2016) não observou este efeito nos parâmetros de rigidez arterial em idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares após a ingestão de 100g de GB contendo 12 mmol de nitrato.

Demais estudos avaliaram o efeito crônico da ingestão de SB sobre os parâmetros de rigidez arterial. Velmurugan et al. (2016) observaram melhora da (PWV) em hipercolesterolêmicos não tratados após a ingestão de 250 mL de SB contendo 6 mmol de nitrato durante 6 semanas. Kapil et al. (2015) observaram que a ingestão de 250 mL de SB contendo 6,4 mmol de nitrato durante 2 semanas promoveu melhora do AI e PWV em hipertensos tratados com e sem tratamento medicamentoso. Contudo, Lara et al. (2015) não observaram melhora de PWV após a ingestão de SB contendo 600mg de nitrato durante 7 dias por adultos saudáveis.

2.6 Disfunção endotelial na gestação

Durante a gestação, o sistema cardiovascular sofre modificações para proporcionar adequado desenvolvimento do feto. Alterações na função endotelial estão associadas com desenvolvimento de pré-eclâmpsia (PE) e restrição do crescimento fetal intrauterino (RCIU) (Osol et al. 2017; Singh et al. 2015; Garcia et al., 2007; Savvidou et al. 2003), que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Graves e Davis, 2018).

RCIU é uma das maiores complicações gestacionais, sendo responsável por aumentar a morbidade e mortalidade no período perinatal e infância. Singh et al. (2014) observaram que gestantes diagnosticadas com RCIU apresentavam menor concentração plasmática do marcador da produção de NO quando comparada a gestantes sem RCIU. Karanam et al. (2014) observaram que gestantes com PE apresentavam redução do fluxo sanguíneo tecidual quando comparadas com gestantes saudáveis.

Ao avaliar a função endotelial de gestantes com pelo menos um fator de risco para PE, por meio da FMD, Garcia et al. (2007) observaram que aquelas que desenvolveram PE ao longo da gestação apresentavam redução de aproximadamente 5% na FMD quando comparado com aquelas que não desenvolveram PE. Savvidou et al. (2003) observaram que gestantes que desenvolveram PE e RCIU apresentavam redução de 5 e 2,5% na FMD, respectivamente, quando comparado com gestantes saudáveis. Dipla et al. (2017) ao avaliar a função microvascular de gestantes diabéticas observaram que estas apresentavam redução da capacidade oxidativa quando comparadas a gestantes saudáveis.

A função endotelial preservada durante o período gestacional é de grande importância para manutenção da saúde cardiovascular materna e para evitar complicações no desenvolvimento fetal. Apesar de evidências científicas mostrarem efeitos benéficos do

consumo de SB sobre os parâmetros de função endotelial e de oxigenação tecidual ainda não há estudos avaliando o efeito do SB sobre estes parâmetros em gestantes.

3. Justificativa

Diversos estudos têm investigado o efeito a ingestão de alimentos ricos em nitrato sobre os parâmetros de saúde vascular. A beterraba é uma das principais fontes dietéticas do nitrato e o interesse em investigar o feito de sua ingestão sobre a saúde vascular se dá pela capacidade do nitrato ser reduzido a nitrito e, posteriormente, a óxido nítrico, que é uma importante molécula vasoativa.

A escolha das gestantes como a população do estudo pode ser explicada pela ausência de estudos que investiguem o efeito a ingestão de alimentos fontes de nitrato dietético sobre a função endotelial e parâmetros de oxigenação tecidual. Além disso, a gestação é um período onde alterações na função endotelial macro e microvascular podem estar associadas ao desenvolvimento de complicações como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal intrauterino.

Dessa forma, o presente estudo propõe a avaliar o efeito a ingestão do suco de beterraba rico em nitrato sobre função endotelial macrovascular avaliada por meio da dilatação fluxo mediada da artéria braquial e sobre os parâmetros de oxigenação tecidual por meio da espectroscopia do infravermelho próximo em gestantes.

4. Objetivos

4.1 Geral

Avaliar o efeito da ingestão de uma única dose do SB sobre a função endotelial e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes.

4.2 Específicos

- Avaliar a concentração urinária de nitrato antes e após a ingestão do SB;
- Avaliar o efeito da ingestão do SB sobre a função endotelial;
- Avaliar o efeito da ingestão do SB sobre os parâmetros de oxigenação tecidual.

5. Métodos

5.1 Voluntárias

Foram recrutadas 36 gestantes através de eventos comunitários e cartazes distribuídos na Universidade Federal do Rio de Janeiro Campus Macaé e em Unidades Básicas de Saúde na mesma cidade. Todos os participantes foram informados da natureza e da finalidade da pesquisa e forneceram consentimento por escrito para participar através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Os critérios de inclusão foram: gestantes com idade superior a 18 anos e com idade gestacional entre 20 e 35 semanas. Os critérios de exclusão foram: diabetes *mellitus* e gestacional, doenças hipertensivas específicas da gestação, HIV positivo, doenças renais ou hepáticas, história familiar de síndromes hipertensivas, alergia a beterraba, uso de antioxidantes e medicamentos que alteram a função endotelial e uso de antibióticos 2 semanas antes de iniciar os procedimentos experimentais. Doze gestantes finalizaram o estudo (Figura 2).

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé (CAAE #56732216.5.0000.5699) e foi registrado na plataforma de ensaios clínicos (#NCT03315806).

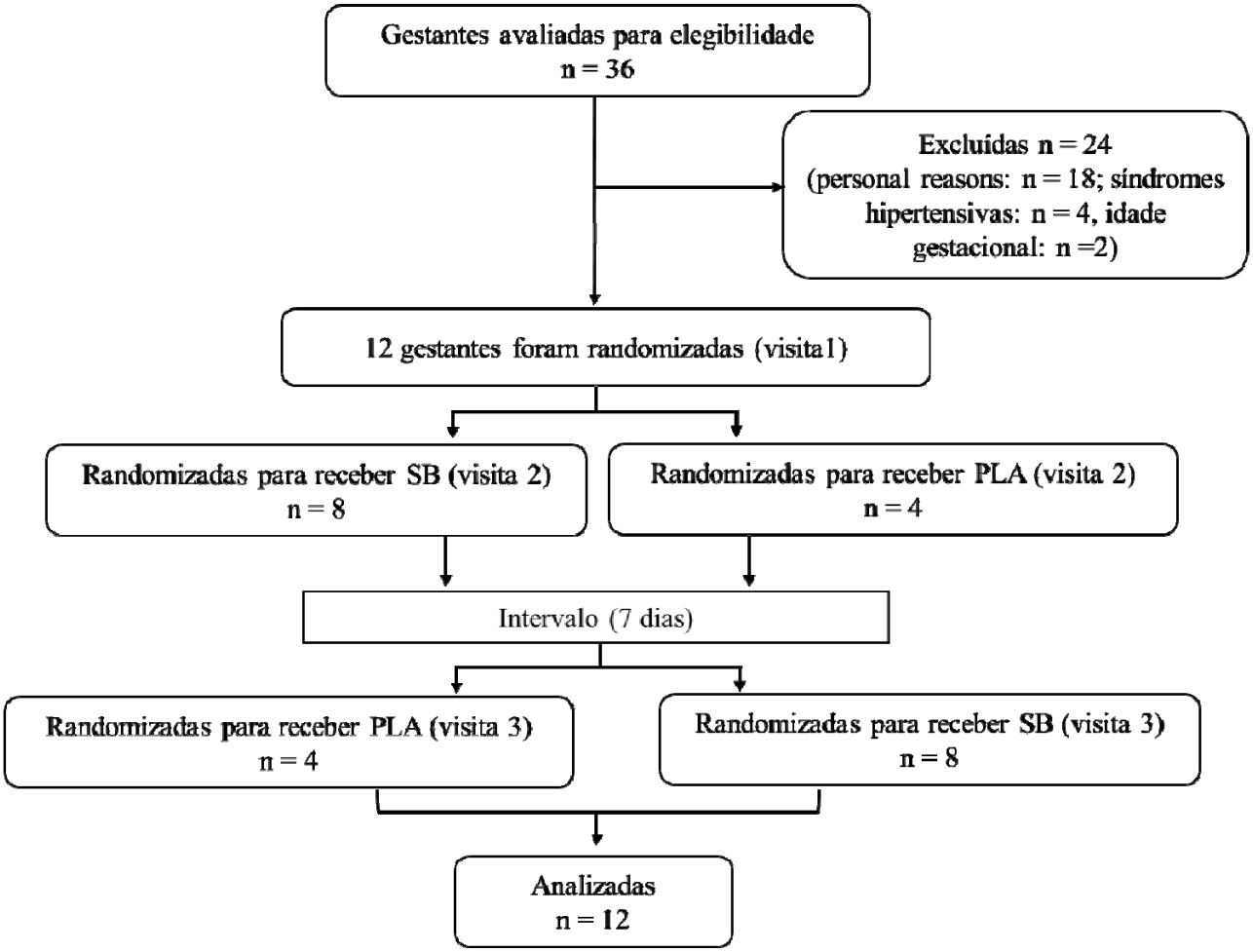

Figura 2. Fluxograma do progresso das fases do estudo. SB, suco de beterraba; PLA, placebo.

5.2 Modelo experimental

O estudo foi randomizado, cruzado, duplo cego e controlado com placebo. Todas as voluntárias visitaram o laboratório de Dinâmica Vascular da Universidade Federal do Rio de Janeiro na cidade de Macaé em três momentos com o intervalo de uma semana entre cada visita. Na primeira visita foi realizada medidas controle (PRÉ) da função endotelial, dos parâmetros de oxigenação tecidual e coleta de sangue seguido da randomização. Na segunda e terceira visitas foi realizada coleta de urina antes (T0) e 150 minutos (T150) após a intervenção nutricional. A função endotelial e os parâmetros de oxigenação tecidual foram avaliados 120 (T120) e 140 (T140) minutos após a intervenção nutricional, respectivamente (Figura 1). Todas as visitas foram realizadas entre 07:00 e 12:00. As voluntárias foram instruídas a realizarem jejum de 8h antes de cada visita, não consumir alimentos ricos em nitrato (Anexo 2), café e chás e não realizar higiene bucal na manhã das visitas.

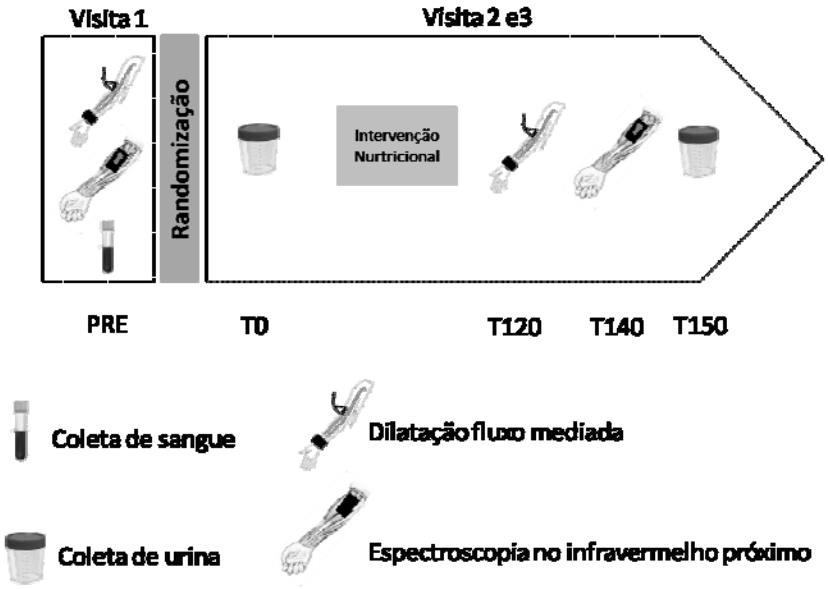

Figura 3. Modelo experimental - Efeito da ingestão de uma dose de suco de beterraba sobre função endotelial macrovascular e parâmetros de oxigenação tecidual em gestantes.

5.3 Intervenção nutricional

As beterrabas (*Beta vulgaris L.*) foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio e posteriormente foram centrifugadas (Modelo CE700, Black & Decker, Baltimore,

MD). Para preparo do SB, o suco resultante foi pasteurizado (70ºC durante 1 min) e 140 mL foram distribuídas em duas garrafas de cor escura. Para preparação do PLA o conteúdo de nitrato foi removido por meio de uma resina de troca iônica A-502 (Purolite®, Bala Cynwyd, PA). O conteúdo de nitrato no SB e PLA foi de 8,95 ± 0,28 e 0,27 ± 0,02 mmol/140 mL, respectivamente.

5.4 Análise de nitrato urinário

A análise de nitrato urinário foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com Croitoru MD (2012). Inicialmente, 100 µL de amostra foi desproteinizada com 100 µL de acetonitrila e centrifugada durante 10 minutos a 16873 *g*. Em seguida, 150 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo e 150 µL da fase móvel foi adicionado. A solução foi misturada e 150 µL foi injetado no sistema do HPLC.

O sistema HPLC foi equipado com uma coluna C18 150 x 4,6 mm (Kromasil) acoplada a uma coluna guarda C18 50 x 4,6 mm (Kromasil). A detecção do nitrato foi realizada por um detector fotodiodo SPD-M20A no comprimento de onda de 222 nm. A fase móvel foi composta por 5 mM hidróxido de tetrabutilamônio (Sigma - Aldrich) (pH = 2,5) e acetonitrila (90:10) e o fluxo isocrático a 1 mL/min. O tempo de retenção foi 8 minutos.

Para o preparo da fase móvel, 4 g de hidróxido de tetrabutilamônio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL e posteriormente avolumado com água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 2,5 com aproximadamente 200 µL de ácido sulfúrico (Êxodo científica). Para o preparo do padrão foi utilizado no nitrato de sódio (Sigma -Aldrich) e foram utilizados 6 pontos para a curva de calibração (0 - 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1,0 -2,0 µM).

A concentração de nitrato na urina foi corrigida pela concentração de creatinina, a qual também foi analisada por HPLC de acordo com Persky et al. (2003). Inicialmente, 150 µL da amostra foi desproteinizada com 150 µL de acetonitrila e centrifugada durante 10 minutos a 16873 *g*. 4 µL do sobrenadante foi retirado e diluído em 796 µL de água deionizada. 100 µL foi injetado no sistema do HPLC.

O sistema HPLC foi equipado com uma coluna C18 100 x 4,6 mm (Kromasil) acoplada a uma coluna guarda C18 50 x 4,6 mm (Kromasil). A detecção da creatinina foi realizada por um detector fotodiodo SPD-M20A no comprimento de onda de 210 nm. A fase

móvel foi composta por 50 mM fosfato de potássio monobásico (pH = 4,0) e o fluxo isocrático a 0,8 mL/min.

Para o preparo da fase móvel 6,8 g de fosfato de potássio monobásico (Sigma) foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL e posteriormente avolumado com água deionizada. O pH da solução foi ajustado para 4,0 com aproximadamente 3 µL de ácido fosfórico (Vetec). Para o preparo do padrão foi utilizado creatinina anidra cristalizada (Sigma - Aldrich) e foram utilizados 8 pontos para a curva de calibração (0 - 1,56 - 3,12 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 µM).

5.5 Função endotelial

A avaliação da dilatação fluxo mediada foi em um ambiente calmo e com temperatura constante (22-25º C). Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo examinador que não era informado sobre a intervenção nutricional oferecida. As gestantes permaneceram sentadas formando um ângulo de 90º entre o fêmur e o tronco. A análise da FMD foi avaliada de acordo com Oliveira et al. (2016). Para análise foi utilizado um ultrassom bidimensional com doppler colorido e espectral (Prosound Alpha 6®, Aloka) e transdutor linear com frequência de 5,0 a 13,0 MHz (modelo UST-5413, Aloka). O transdutor foi posicionado na face medial do braço para obter imagem longitudinal da artéria braquial, 2-5 cm acima da prega cubital. Um esfigmomanômetro foi posicionado no braço para promover a oclusão arterial.

Inicialmente, a artéria braquial é monitorada durante 30 segundos para mensurar o maior diâmetro basal (DB). Em seguida, o esfigmomanômetro é inflado até a pressão de 250 mmHg para promover a oclusão arterial durante 5 minutos. Logo após o esfigmomanômetro é liberado e o fluxo sanguíneo rapidamente aumenta e induz a liberação do NO pelo endotélio. A artéria braquial é monitorada durante 2 minutos para mensurar o maior diâmetro após a desoclusão (DP). A FMD foi calculada como a percentual de dilatação do DP relativa a dilatação do DB. O coeficiente de variação intradia foi de 5,1 ± 0,31 % e interdia 5,1 ± 0,12 %.

5.6 Parâmetros de oxigenação tecidual

A avaliação das mudanças na saturação de oxigênio tecidual (StO_2) foi realizado pela espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS). O equipamento foi posicionado no músculo flexor do antebraço dominante da voluntária e um esfigmomanômetro foi

posicionado no braço. Após a estabilização dos sinais da StO_2 por 30 segundos, o esfigmomanômetro foi inflado até a pressão de 250 mmHg para obstruir o fluxo sanguíneo para os músculos do antebraço durante 5 minutos. O período de reperfusão após a liberação do esfigmomanômetro foi monitorado durante 2 minutos. Durante todas as análises, o NIRS foi conectado a um computador via Bluetooh para aquisição dos dados. Para conversão e subsequente análise dos dados foi utilizado o *software* Oxysoft version 2.1.6; Artinis Medical Systems. O *software* calcula as mudanças na absorção da luz em diferentes comprimentos de onda, 750 e 850 nm para hemoglobina oxigenada (O_2Hb) e hemoglobina desoxigenada (HHb), respectivamente. StO_2 foi calculado pela seguinte formula: (O_2Hb / O_2Hb + HHb)*100. Os seguintes parâmetros do NIRS foram considerados para análise estatística: (a) Baseline StO_2 ($StO_{2\ base}$), o qual representa a media dos 30 segundos da StO_2 antes da oclusão arterial; (b) Taxa de desaturação ($StO_{2\ slope_1}$), que representa a mudança da StO_2 durante o período de oclusão arterial (taxa de mudança na StO_2 por tempo); (c) StO_2 mínimo ($StO_{2\ min}$), que corresponde o menor valor da StO_2 durante o período de oclusão arterial; (d)Taxa de resaturação ($StO_{2\ slope_2}$), corresponde ao incremento da StO_2 durante o período de reperfusão; (e) StO_2 Máxima ($StO_{2\ max}$), que representa o maior valor de StO_2 durante o período de reperfusão; (f) Tempo até StO_2 máximo ($StO_{2\ tmax}$), que corresponde ao tempo necessário para alcançar o $StO_{2\ max}$ (Figura 3).

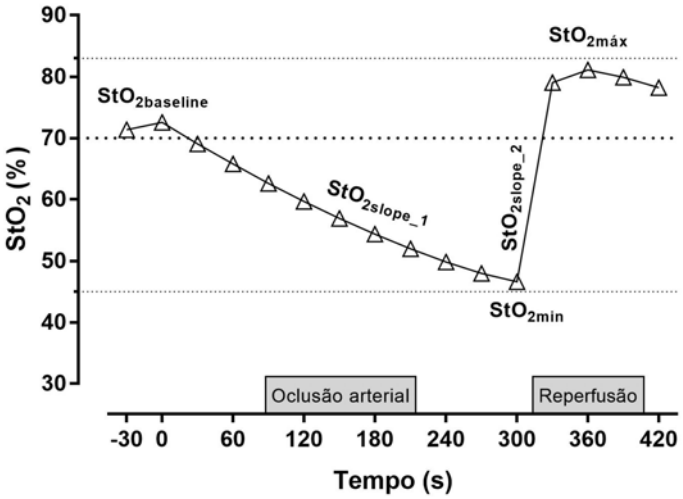

Figura 4. Parâmetros de oxigenação tecidual.

5.7 Análise estatística

A normalidade e homogeneidade de variâncias dos dados foram avaliados pelos testes Shapiro-Wilk e Mauchly, respectivamente. Para identificar diferenças na FMD e nos parâmetros de oxigenação tecidual entre PRE, PLA e SB foi utilizado o teste ANOVA uma via com medidas repetidas. Para identificar diferenças no nitrato urinário foi utilizado ANOVA duas vias. Diferenças estatísticas foram estabelecidas no nível de confiança de 0,05. Todas as análises foram realizadas usando o pacote estatístico IBM SPSS Statistics versão 23 for Mac, Chicago, IL) e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP).

6. Resultados

A normalidade e homogeneidade de variâncias foi violado para StO_{2base} e foi utilizado o teste Fridman para análise estatística dessa variável. Para todas as outras variáveis, a normalidade e homogeneidade de variâncias não foram violadas. De 36 gestantes recrutadas para avaliação de elegibilidade, 12 foram randomizadas e completaram o estudo. Além disso, 1 gestante foi excluída para análise de StO_2 devido a razões técnicas. As características basais estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Características basais: demográfica, bioquímica e clínica.

Demográficos	
N	12
Idade (anos)	27 ± 6,51
Idade gestacional	25,6 ± 6,24
Massa corporal (KG)	79,14 ± 20,20
Índice de massa corporal pré-gestacional (Kg/m^2)	24,34 ± 4,37
Dobra cutânea do antebraço (mm)	2,17 ± 0,83
Bioquímica	
Colesterol total (mg/dl)	252,25 ± 40,36
Glicose (mg/dl)	76,3 ± 9,76
HDL-colesterol (mg/dl)	61,2 ± 13,16
LDL-colesterol (mg/dl)	151,5 ± 40
TG (mg/dl)	157,5 ± 33,12
TG/HDL-colesterol (mg/dl)	2,65 ± 0,65
Log(TG/HDL-colesterol) (mg/dl)	0,41 ± 0,10
Clinica	
PAS (mm Hg)	102,88 ± 6,27
PAD (mm Hg)	70 ± 6,63
FC	82,5 ± 8,04

TG = triglicerídeos, PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, FC = frequência cardíaca.

Nitrato urinário

Não houve diferença no nitrato urinário (mmol.mmol- 1 de creatinina) entre os grupos (PLA: 0,02 ± 0,00 vs SB: 0,02 ± 0,00, P = 0,86) em T0. Foi observado um significativo efeito principal para o tempo (P = 0,001). O teste Post hoc revelou aumento de nitrato urinário em T150 após o consumo de SB comparado a T0 (T150: 0,20 ± 0,13 vs T0: 0,02 ± 0,00, P = 0,000), mas não em PLA quando comparado a T0 (T150: 0,02 ± 0,00 vs T0: 0,02 ± 0,00, P = 0,992). Além disso, houve significativo efeito da interação tratamento x tempo para o nitrato urinário (P = 0,001). O teste Post hoc revelou um aumento do nitrato urinário após o consumo de SB quando comparado a PLA em T150 (P = 0,001).

Função endotelial

Os parâmetros da função endotelial estão apresentados na figura 3 e na tabela 2. Foi observado diferença significativa na FMD após o consumo de SB quando comparado a PRE (SB: 11,00 ± 1,67 vs PRE: 5,53 ± 1,17, P = 0,000) e PLA (PLA: 5,34 ± 1,31, P = 0,000), mas não entre PRE e PLA (P = 1,000). Não foi observada diferença significativa em DB e DP entre PRE e PLA (DB = PRE: 3,39 ± 0,63 vs PLA: 3,34 ± 0,50, P = 1,000; DP = PRE: 3,56 ± 0,66 vs PLA: 3,52 ± 0,53, P = 1,000) e entre PRE e SB (DB = SB: 3,28 ± 0,66, P = 1,000; DP = BJ: 3,58 ± 0,81, P = 1,000). Além disso, não foi observada diferença significativa em DB e DP entre PLA e SB (P = 1,000).

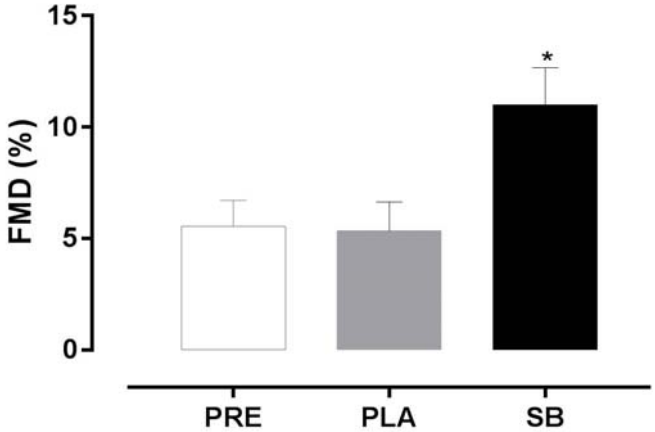

Figura 5. Valores da média da FMD em PRE e após a ingestão de PLA e SB.

Tabela 2. Parâmetros de função endotelial macrovascular em PRE e após a ingestão de PLA e SB. (Valores de média e desvio padrão).

	PRE		PLA		SB		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	*F*
FMD (%)	5.53	1.17	5.34	1.31	11.00***	1.67	1.95
DB (mm)	3.39	0.63	3.34	0.50	3.28	0.66	0.07
DP (mm)	3.56	0.66	3.52	0.53	3.58	0.81	0.03

FMD, dilatação fluxo mediada; DB, máximo diâmetro basal; DP, máximo diâmetros de pico.
f, Cohen f.
***Diferença estatística comparado a PRE e PLA (P<0.001); one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

Função microvascular

Os parâmetros da função microvascular estão apresentados na figura 4 e na tabela 3. Não foi observada diferença estatística em StO_2 (PRE: 71,39 ± 8,97, PLA: 69,69 ± 4,25, SB: 71,19 ± 5,81, P = 0,336), $StO2_{slope_1}$ (PRE : -0,52 ± 0,30, PLA: -0,60 ± 0,32, SB: -0,59 ± 0,2, P = 0,908), $StO2_{min}$ (PRE: 54,10 ± 13,03, PLA: 52,83 ± 12,99, SB: 53,37 ± 12,41, P = 0,973) , $StO2_{slope_2}$ (PRE: 1,03 ± 0,65, PLA: 1,03 ± 0,55, SB: 1,06 ± 0,72, P = 0,993), $StO2_{max}$ (PRÉ: 78,76 ± 3,04, PLA: 79,63 ± 1,18, SB: 80,15 ± 3,56, P = 0,611) e $StO2_{tmax}$ (PRE: 49,28 ± 17,84, PLA: 43,06 ± 8,43, SB: 43,43 ± 11,68, P = 0,475).

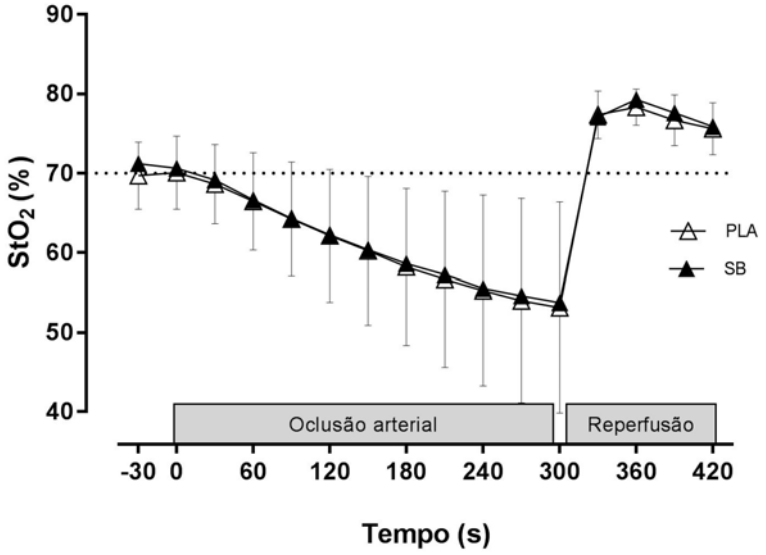

Figura 6. Parâmetros de StO_2 após a ingestão de PLA e SB.

Tabela 3. Parâmetros de StO_2 em PRE e após a ingestão de PLA e SB (Valores de média e desvio padrão).

	PRE		PLA		SB		*P*	*f*
	Média	DP	Média	DP	Média	DP		
$StO_{2\ base\ (\%)}$	71.39	8.97	69.69	4.25	71.19	5.81	0.336	0.11
$StO_{2\ slope_1}$ (% s^{-1})	-0.52	0.30	-0.60	0.32	-0.58	0.29	0.908	0.07
$StO_{2\ Min}$ (%)	54.10	13.03	52.83	12.99	53.37	12.41	0.973	0.14
$StO_{2\ slope_2}$ (% s^{-1})	1.03	0.65	1.03	0.55	1.06	0.72	0.993	0.00
$StO_{2\ Max}$ (%)	78.96	3.04	79.63	1.18	80.15	3.56	0.985	0.18
$StO_{2\ tmax}$ (s)	49.28	17.84	43.06	8.43	43.43	11.68	0.475	0.22

$StO_{2\ base}$, StO_2 basal; $StO_{2\ slope_1}$, taxa de desaturação; $StO_{2\ min}$, StO_2 mínimo; $StO_{2\ slope_2}$, taxa de resaturação; $StO_{2\ Max}$, StO_2 máximo; $StO_{2\ tmax}$, tempo até alcançar $StO_{2\ máx.}$

f, Cohen f.

One-way ANOVA seguido pelo teste Post hoc de Bonferroni.

7. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de uma dose única de SB sobre a função endotelial macrovascular e sobre os parâmetros de StO_2 em gestantes. Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da ingestão de uma única dose de suco de beterraba sobre FMD e os parâmetros de StO_2 ($StO2_{base}$, $StO2_{min}$, $StO2_{Slope_1}$, $StO2_{máx}$, $StO2_{slope2}$ e $StO2_{Tmax}$) em gestantes. O principal achado deste estudo é que a ingestão de uma única dose de SB melhorou a FMD em gestantes.

A FMD é uma técnica não invasiva que avalia a função endotelial (Harris et al., 2010). Esta análise consiste na redução do fluxo sanguíneo para o braço por meio da oclusão arterial e, posteriormente, aumento do fluxo sanguíneo devido ao *shear stress*, um fenômeno mediado pela liberação de NO. Indivíduos com doenças cardiovasculares apresentam baixos valores de FMD enquanto que o aumento da FMD diminui o risco de doenças cardiovasculares.

Baixos valores de FMD durante a gestação estão associados com complicações para mãe e o feto, como a PE e RCIU. Tem sido observado que gestantes que desenvolveram PE e restrição do crescimento fetal intrauterino apresentavam valores de FMD de 3,5 e 6,2%, respectivamente, enquanto que as gestantes que não desenvolveram estas complicações apresentavam FMD de 8% (Green et al., 2011). Os autores concluem que a função endotelial está prejudicada em gestantes que desenvolveram PE e RCIU intrauterino. No presente estudo, apesar das gestantes não desenvolverem estas complicações, foi observado baixo valor de FMD (5%), sugerindo prejuízo na função endotelial. Após a ingestão de SB, a FMD aumentou de 5 para 11% (significando um aumento de 110%), alcançando valores similares ao de gestantes que não desenvolveram PE e RCIU (Savvidou et al., 2003).

Os resultados de FMD do presente estudo estão de acordo com estudos prévios (Asgary et al., 2016; Oliveira et al., 2016; Kapil et al., 2015). Oliveira et al. (2016) observaram aumento na FMD após a ingestão de uma única dose de 100g de um gel de beterraba rico em nitrato em idosos com fatores de risco para doenças cardiovasculares. Kapil et al. (2015) mostraram aumento da FMD após 28 dias de ingestão de 250 mL de SB em hipertensos. Asgary et al. (2016) observaram aumento na FMD de hipertensos após 2 semanas de consume de 250 mL de SB e 250 g de beterraba cozida. Dessa forma, os resultados deste estudo sugerem que o efeito da ingestão de uma única dose de SB na FMD de gestantes pode ser o mesmo encontrado em outras populações estudadas.

Aumento do nitrato urinário está em acordo com estudos prévios (Baião et al., 2016; Oliveira et al., 2016). Baião et al. (2016) mostraram aumento no nitrato urinário após a ingestão de uma única dose de 100 mL de SB. Oliveira et al. (2016) mostraram aumento no nitrato urinário após a ingestão de uma única dose de gel de beterraba. Siervo et al. (2016) observaram aumento no nitrato urinário após a ingestão de 140 mL de SB durante 7 dias.

Os parâmetros de StO_2 durante o período de oclusão arterial (StO_{2min} e $StO_{2\ Slope_1}$) fornecem informações sobre a extração de oxigênio tecidual. Dipla et al (2017) recentemente avaliaram os parâmetros de StO_2 durante a oclusão arterial de gestantes diabéticas (GMD) e não diabéticas. No grupo GMD, os valores de StO_2 foram maiores do que no grupo das gestantes não diabéticas (≈ 55% para GMD e 40% para gestantes não diabéticas), sugerindo que o grupo GMD apresenta reduzida capacidade de extração de O_2 pelo músculo esquelético. NO presente estudo, gestantes apresentavam valor de $StO_{2\ min}$ próximo aos valores do grupo GMD do estudo de Dipla et al. (2017), sugerindo que as gestantes do presente estudo possivelmente apresentam prejuízo na capacidade de extração de O_2.

É conhecido que a glicose plasmática elevada aumenta o estresse oxidativo (Asmat et al., 2016; Rochette et al., 2014), o qual prejudica a extração de O_2 pelos tecidos (disfunção mitochondrial) (Pedersen et al., 2009). No presente estudo, as gestantes apresentavam glicemia plasmática normal (<92 mg/dL), contudo, elas apresentavam colesterol total elevado (>200 mg/dL). O colesterol total elevado tem sido associado com aumento do estresse oxidativo (Rasool et al. 2010), assim como a glicose elevada, podendo promover prejuízo na extração de O_2 pelos tecidos. Além disso, observamos uma correlação significativa entre $StO_{2\ min}$ e colesterol total (dados não mostrados), o que poderia explicar o alto valor de $StO_{2\ min}$ na gestação. Era esperado que houvesse melhora nos parâmetros de StO_2 durante a oclusão arterial devido ao efeito do nitrato na função mitocondrial.

Tem sido observado que a via nitrato-nitrito-NO pode modular o consume de O_2 na mitochondria. No complex IV da cadeia transportadora de elétrons, NO compete com O_2 pela Citocromo C oxidase (COX) e quando o NO se liga a COX o O_2 torna-se disponível (Larsen et al., 2011). Contudo, não foram observadas mudanças nos parâmetros de StO_2 durante a oclusão arterial. A bioconversão do nitrito a NO necessita que a hemoglobina esteja saturada com aproximadamente 50% de O_2 (Lundberg et al., 2008). No presente estudo observamos que a hemoglobina estava saturada com 53% de O_2, o que indica que o ambiente foi favorável

para conversão do nitrito a NO. Embora houvesse um ambiente favorável para conversão do nitrito a NO, não houve mudanças na extração do oxigênio muscular.

Durante o período de reperfusão, os parâmetros de StO_2 refletem a habilidade de recrutar um maior número de arteríolas (Ryan et al., 2014). Após a desoclusão arterial, há um aumento no fluxo sanguíneo para o membro em isquemia, o que promove aumento na liberação de substâncias vasoativas (Engelke et al., 1996). Era esperado uma melhora nos parâmetros de StO_2 após a ingestão de SB devido a propriedade vasodilatadora do NO. Contudo, não houve diferença nos parâmetros de StO_2 após a ingestão de SB.

Os valores de $StO_{2\ máx}$ e $StO_{2\ Slope_2}$ no presente estudo foi próximo aos valores das gestantes não diabéticas no estudo de Dipla et al (2017), sugerindo que as gestantes do presente estudo apresentam habilidade para recrutar maior número de arteríolas. Assim, a reatividade microvascular preservada nas gestantes do presente estudo pode ser uma possível explicação para ausência de efeito nestes parâmetros após a ingestão de SB. É especulado que o NO pode apresentar seus efeitos vasodilatadores apenas em áreas com função microvascular prejudicada para evitar que ocorra dilatação generalizada em capilares perfundidos. Como a função microvascular está preservada nas gestantes do presente estudo, os capilares estão suficientemente perfundidos e não necessitam de aumento da perfusão.

As diferenças observadas entre as respostas na função macro e microvascular após a ingestão de SB pode ser explicada pela heterogeneidade das células endoteliais. Diferenças nas células endoteliais são reportadas na morfologia, função, expressão gênica e composição de antígenos (Aird., 2012). Além disso, células endoteliais exibem diferenças dependendo do tipo de vaso ou localização do órgão em que estão presentes (Potente e Mäkinen, 2017). Portanto, a ação do NO pode ser diferente entre macro e microvasculatura.

8. Considerações finais

O efeito da ingestão de uma única dose de SB, uma fonte de nitrato dietético, na função endotelial macrovascular e nos parâmetros de StO_2 foi investigado. Os resultados do presente estudo mostram que SB melhorou a função endotelial macrovascular acompanhado pelo aumento da concentração de nitrato urinário, porém não melhorou os parâmetros de StO_2 em gestantes. Os efeitos benéficos na função endotelial macrovascular observados após a ingestão de SB pode ser uma alternativa para contribuir na prevenção de doenças cardiovasculares nesta população. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar o efeito do consume de SB sobre complicações vasculares durante a gestação.

8.1 Recomendações futuras:

Para trabalhos futuros se propõe:

- Avaliar o efeito da ingestão prolongada do suco de beterraba sobre os parâmetros de função endotelial macrovascular e oxigenação tecidual em gestantes;
- Avaliar o efeito da ingestão do suco de beterraba em gestantes que apresentam fatores de risco para disfunção endotelial.

9. Manuscrito em submissão

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo, o qual foi submetido a publicação na Revista British Journal of Nutrition no dia 07 de dezembro de 2017. Título: *A single dose of beetroot juice improves endothelial function but not tissue oxygenation in pregnant women: a randomized clinical trial* (Anexos 3 e 4).

10. Referências

AHLUWALIA, A. et al. Dietary Nitrate and the Epidemiology of Cardiovascular Disease: Report From a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. **J Am Heart Assoc**, v. 5, n. 7, p. 1-11, 2016.

AIRD, W.C. Endothelial cell heterogeneity. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n . 1, p. 1-3, 2012.

ASGARY, S. et al. Improvement of hypertension, endothelial function and systemic inflammation following short-term supplementation with red beet (Beta vulgaris L.) juice: a randomized crossover pilot study. **J Hum Hypertens**, v. 30, n. 10, p. 627-632, 2016.

ASMAT, U. et al. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review **Saudi Pharm J.,** v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

BAIÃO, D. et al. Beetroot juice increase nitric oxide metabolites in both men and women regardless of body mass. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n.1, p. 40-46, 2016.

BAILEY, S.J. et al. Inorganic nitrate supplementation improves muscle oxygenation, O_2 uptake kinetics, and exercise tolerance at high but not low pedal rates. **J Appl Physiol (1985)**, v. 118, n. 11, p. 1396-1405, 2015.

BAKKER, E. et al. Acute dietary nitrate supplementation improves arterial endothelial function at high altitude: A double-blinded randomized controlled cross over study. **Nitric Oxide**, v. 50, p. 58-64, 2015.

BENJAMIN, E. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. e67-e492, 2018.

CHEN, L. et al. Effects of vascular nitric oxide pathway on vascular smooth muscle cell proliferation. **Int J Cardiol**, v.150, n.3, p. 370-372, 2011.

CLIFFORD, T. The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2801-28022, 2015.

CROITORU, M.D. Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 911, p. 154-161, p. 2012.

DIPLA, K. et al. Impairments in microvascular function and skeletal muscle oxygenation in women with gestational diabetes mellitus: links to cardiovascular disease risk factors. **Diabetologia**, v. 60, n. 1, p. 192-201, 2017.

DONATO, A.J. et al. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol**, v.89, p. 122-135, 2015.

DOW, C.A. Endothelial vasodilator function in normal-weight adults with metabolic syndrome. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 41, n. 10, p. 1013-1017, 2016.
ENGELKE, K.A. et al. Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in human forearm. **J Appl Physiol**, v. 81, n. 4, p. 1807-1814, 1996.

FAULX, M.D., WRIGHT, A.T., HOIT, B.D. 1 Detection of endothelial dysfunction with brachial artery ultrasound scanning, v. 145, n. 6, p. 943-951, 2003.

GARCIA, R.G. et al. Raised C-reactive protein and impaired flow-mediated vasodilation precede the development of preeclampsia. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 1, p. 98-103, 2007.

GAYDA, M. et al. Cardiometabolic and traditional cardiovascular risk factors and their potential impact on macrovascular and microvascular function: preliminary data. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 59, n. 1, p. 53-65, 2015.

GHIADONI, L. Metabolic syndrome and vascular alterations in normotensive subjects at risk of diabetes mellitus. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 440-445, 2008.

GILCHRIST, M. et al. Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 60, p. 89-97, 2013.

GKALIAGKOUSI, E. et al. Clinical Significance of Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 17, n. 11, p. 1-9, 2015.

GOVONI, M. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 333-337, 2008.

GRAVES, C.R., DAVIS, S.F. Cardiovascular Complications in Pregnancy: It Is Time for Action. **Circulation**, p. 2018.

GREEN, D.J. Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 363-369, 2011.

HARRIS, R.A. et al. Ultrasound Assessment of Flow-Mediated Dilation. **Hypertension**, v. 55, n. 5, p. 1075-1085, 2010.

HASKELL, C. Effect of dietary nitrate on cerebral oxygenation and cognitive performance during cycle exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 571, 2013.

HAUN, C.T. Differential vascular reactivity responses acutely following ingestion of a nitrate rich red spinach extract. **Eur J Appl Physiol**, v. 116, 2016.

HOBBS, D.A. Acute ingestion of beetroot bread increases endothelium-independent vasodilation and lowers diastolic blood pressure in healthy men: a randomized controlled trial. **J Nutr**, v. 143, n. 9, p. 1399-1405, 2013.

HORD, N.G., TANG, Y., BRYAN, N.S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 1, 2009.
HORIUCHI, M. et al. Muscle oxygenation profiles between active and inactive muscles with nitrate supplementation under hypoxic exercise. **Physiol Rep**, v. 5, n. 20, p. 1-13, 2017.

HUGHES, W.E. et al. Effects of acute dietary nitrate supplementation on aortic blood pressure and aortic augmentation index in young and older adults. **Nitric Oxide**, v. 59, p. 21-27, 2016.

JAJJA, A. Beetroot supplementation lowers daily systolic blood pressure in older, overweight subjects. **Nutr Res**, v. 34, n. 10, p. 868-875, 2014.

JAMWAL, S., SHARMA, S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders. **Inflamm Res**, p. 1-15, 2018.

JORIS, P.J., MENSINK, R.P. Beetroot juice improves in overweight and slightly obese men postprandial endothelial function after consumption of a mixed meal. **Atherosclerosis**, v. 231, n. 1, p. 78-83, 2013.

JUNQUEIRA, C.L.C. et al. Evaluation of endothelial function by VOP and inflammatory biomarkers in patients with arterial hypertension. **J Hum Hypertens**, p. 1-9, 2018.

KAPIL, V. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 320-327, 2015.

KARANAM, V.L., PAGE, N.M., ANIM-NYAME, N. Maternal tissue blood flow and oxygen saturation in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 178, p. 148-152, p. 2014.

KENT, G.L et al. Effect of dietary nitrate supplementation on thermoregulatory and cardiovascular responses to submaximal cycling in the heat. **Eur J Appl Physiol**, v. 118, n. 3, p. 657-668, 2018.

KOLB, L. et al. Oral Nitrate Increases Microvascular Reactivity and the Number of Visible Perfused Microvessels in Healthy Volunteers. **J Vasc Res**, v. 54, n. 4, p. 209-216, 2017.

LARA, J. et al. Effects of handgrip exercise or inorganic nitrate supplementation on 24-h ambulatory blood pressure and peripheral arterial function in overweight and obese middle age and older adults: A pilot RCT. **Maturitas**, v. 82, n. 2, p. 228-35, 2015.

LARSEN, F.J. et al. Dietary norganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. **Cell Metab**, v. 13, n. 2, p. 149-159, 2011.

LEE, J.S. et al. Effects of chronic dietary nitrate supplementation on the hemodynamic response to dynamic exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 309, n. 5, p. r459-466, 2015.

LEIVA, A. Role for Tetrahydrobiopterin in the Fetoplacental Endothelial Dysfunction in Maternal Supraphysiological Hypercholesterolemia. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

LIDDER, S., WEBB, A.J. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. **Br J Clin Pharmacol**, v. 75, n. 3, 2013.

LOH et al. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2018.

LUNDBERG, J.O. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 9, p. 623-641, 2015.

LUNDBERG, J.O., WEITZBERG, E., GLADWIN, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-167, 2008.

MACHHA, A., SCHECHTER, A.N. Inorganic nitrate: a major player in the cardiovascular health benefits of vegetables? **Nutr Rev**, V. 70, N. 6, P. 367-372, 2012.

MASSCHELEIN, E. et al. Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. **J Appl Physiol**, v. 113, n. 5, p. 736-745, (1985) 2012.

MCILVENNA, L.C. et al. Beetroot juice versus chard gel: A pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of nitrate bioavailability. **Nitric Oxide**, v. 64, p. 61-67, 2017.

MONTENEGRO, M.F. Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. **Hypertension**, v. 69, n. 1, p. 23-31, 2017.

MORGADO, M. Development of a beetroot-based nutritional gel containing high content of bioaccessible dietary nitrate and antioxidants. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n. 2, p. 153-160, 2016.

MUGGERIDGE, D.J. Acute whole body UVA irradiation combined with nitrate ingestion enhances time trial performance in trained cyclists. **Nitric Oxide**, v. 48, p. 3-9, 2015.

NAPOLI, C. et al. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n.2, p. 89-95, 2013.

OLIVEIRA, G.V. et al. A single dose of a beetroot-based nutritional gel improves endothelial function in the elderly with cardiovascular risk factors. **J Funct Foods**, v. 67, n. 2, p. 301-308, 2016.

OLIVEIRA, G.V. et al. Acute effect of dietary nitrate on forearm muscle oxygenation, blood volume and strength in older adults: A randomized clinical trial. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. 1-15, 2017.

OSOL, G., KO, N.L., MANDALÀ, M. Altered endothelial nitric oxide signaling as a paradigm for maternal vascular maladaptation in preeclampsia. **Curr Hypertens Rep**, v. 19, n. 10, p. 82, 2017.

PAPADOPOULOS, S. Beetroot increases muscle performance and oxygenation during sustained isometric exercise, but does not alter muscle oxidative efficiency and microvascular reactivity at rest. **J Am Coll Nutr**, p. 1-12, 2018.

PEDERSEN, B.L., BAEKGAARD, N., QUISTORFF, B. Muscle mitochondrial function in patients with type 2 diabetes mellitus and peripheral arterial disease: implications in vascular surgery. **Eur J Vasc Endovasc Surg,** v. 38, n. 3, p. 356-64, 2009.

PERSKY, A.M., HOCHHAUS, G., BRAZEAU, G.A. Validation of a simple liquid chromatography assay for creatine suitable for pharmacokinetic applications, determination of plasma protein binding and verification of percent labeled claim of various creatine products. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 794, n. 1, p. 157-165, 2003.

PORTO, L.B. Nitric oxide and asymmetric dimethyl arginine: a novel pathway to explain preterm labor. **Femina**, v. 42, n. 4, p. 179-184, 2014.

POTENTE M, MÄKINEN T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 18, n. 8, p. 477-494, 2017.

POULTER, N.R, PRABHAKARAN, D., CAULFIELD, M. Hypertension. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 801-812, 2015.

RASOOL, A.H. et al. Abnormal microvascular reactivity with hypercholesterolaemia in pregnancy. **Malays J Med Sci**, v. 17, n. 4, p. 14-19, 2010.

RAUBENHEIMER, k. et al. Acute Effects of Nitrate-Rich Beetroot Juice on Blood Pressure, Hemostasis and Vascular Inflammation Markers in Healthy Older Adults: A Randomized, Placebo-Controlled Crossover Study. **Nutrients**, v. 9, n.11, p. 1-19, 2017.
ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 9, p. 2709-29, 2014.

RYAN, T.E. et al. Assessment of in vivo skeletal muscle mitochondrial respiratory capacity in humans by near-infrared spectroscopy: a comparison with in situ measurements. **J Physiol**, v. 592, n. 15, p. 3231-3241, 2014.

SAVVIDOU, M.D. et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. **Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1511-1517, 2003.

SCHROEDER, S. et al. Noninvasive determination of endothelium-mediated vasodilation as a screening test for coronary artery disease: pilot study to assess the predictive value in comparison with angina pectoris, exercise electrocardiography, and myocardial perfusion imaging. **Am Heart** J, v. 138, n. 4, p. 731-739, 1999.

SHAO, Y. et al. Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction: a novel mechanism for maintaining vascular function. **J Hematol Oncol**, v. 7, n. 80, 2014.

SIERVO, M. et al. Dietary nitrate does not affect physical activity outcomes in health older adults in a randomized, crossover trial. **Nutr Res**, v. 36, n. 12, p. 1361-1369, 2016.

SINGH, S. Effect of l-Arginine on Nitric Oxide Levels in Intrauterine Growth Restriction and its Correlation with Fetal Outcome. **Indian J Clin Biochem**, v. 30, n. 3, p. 298-304, 2015.

SU, J.B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World J Cardiol**, v.7, n.11, p. 719-741, 2015.

TOUSOULIS D. et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. **Pharmacol Ther**, v. 144, n.3, p. 253-267, 2014.

VASCONCELLOS, J. et al. Comparison of total antioxidant potential, and total phenolic, nitrate, sugar, and organic acid contents in beetroot juice, chips, powder, and cooked beetroot. **Food Sci. Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 79-84, 2016.

VELMURUGAN S. et al. Antiplatelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: involvement of cGMP and influence of sex. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p.1521-1532, 2013.

VELMURUGAN, S. et al. Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Am J Clin Nutr**, v. 103, n. 1, p. 25-38, 2016.

WANG, F. Association of Circulating Levels of ADMA with Carotid Intima-Media Thickness in Patients with CKD: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Kidney Blood Press Res**, v. 43, n. 1, p. 25-33, 2018.

WEBB, A.J. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784-790, 2008.

WIGHTMAN, E.L. Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitiveperformance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. **Physiol Behav**, v. 149, p. 149-158, 2015.

WIGHTMAN, E.L. et al. Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitive performance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. **Physiol Behav**, v. 149, p. 149-158, 2015.

XU, X. et al. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. **Aging Dis**, v. 8, n. 5, p. 590-610, 2017.

ZHAO, J. Role of Hyperhomocysteinemia and Hyperuricemia in Pathogenesis of Atherosclerosis. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 26, n. 12, p. 2695-2699, 2017**.**

ZHENG, J.J. Assessment of ADMA, estradiol, and progesterone in severe preeclampsia. **Clin Exp Hypertens**, v. 38, n. 4, p. 347-351, 2016.

Anexos

Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado **"Efeito da ingestão de suco a base da beterraba sobre a função vascular e oxigenação microvascular de gestantes com pré-eclampsia."**. Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo investigar os possíveis efeitos do consumo de um produto a base do vegetal beterraba sobre saúde vascular de gestantes com pressão alta. Este estudo justifica-se pela necessidade de melhorar a qualidade de vida da mãe e do bebê e diminuir os gastos públicos com a saúde.

Este documento reúne informações sobre os direitos e deveres dos participantes da pesquisa, da comunidade científica e do Estado, bem como as responsabilidades dos pesquisadores com relação à segurança e a ações que levam aos efeitos benéficos para as voluntárias, justiça, igualdade, dentre outros. É importante lembrar, ainda, que cada área de investigação e cada modalidade (categoria) de pesquisa, além de respeitar os princípios relatados neste texto, devem atender as normas de cada setor e conjunto de regras específicas.

Você comparecerá ao Laboratório de Pesquisa em Dinâmica Vascular, localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro – Polo Ajuda, sala 31, Estrada do Imburo, s/n – bairro Ajuda, no período das 07:00 às 10:00 horas, onde o seu sangue e urina serão coletados e posteriormente analisados em nosso laboratório. Além disso, você será submetida aos seguintes procedimentos com intervalo de, no mínimo, uma semana entre eles:

- jejum de 8h; coleta de sangue e de urina e avaliação dos seguintes parâmetros: (1) pressão sanguínea, (2) batimento cardíaco e (3) saúde dos vasos sanguíneos. Ingestão do suco de beterraba rico em nitrato ou suco pobre em nitrato. Coleta de urina e avaliação dos parâmetros 1, 2 e 3 mencionados acima. A urina será coletada em banheiro privativo no Polo Ajuda da UFRJ segundo orientações dos pesquisadores, como:

(1) Lavar as mãos com água e sabão, **(2)** Assentar no vaso sanitário, afastar os grandes lábios e mantê-los afastados. **(3)** Desprezar a primeira porção de urina no vaso sanitário, **(4)** sem interromper a micção, colocar o frasco de coleta na frente do jato urinário e colher até a metade do frasco. Evitar tocar na parte interna do frasco. **(5)** Desprezar o restante de urina no vaso sanitário, **(6)** fechar o frasco adequadamente.

Além disso:

1. Você deverá seguir as recomendações alimentares e registrar todos os alimentos consumidos nos dias anteriores aos testes.

2. Se você estiver fazendo uso de algum medicamento, o mesmo não será retirado ou o horário de uso não será alterado.

3. Todos os procedimentos experimentais serão realizados em um ambiente limpo e reservado.

4. O material biológico (sangue e urina) doado por você será coletado através de material estéril (isento de bactérias) por uma enfermeira registrada no Conselho Regional de Enfermagem, em um ambiente limpo e reservado, analisado e, em seguida, descartado. Ou seja, as amostras de sangue e urina serão utilizadas somente para esta pesquisa.

5. Você poderá sentir um pequeno desconforto, que dentre esses estão: dor relacionada da utilização da agulha para as coletas de sangue, pequena perda de sangue da veia no local da coleta e formação de hematoma (pequeno acúmulo de sangue no local da coleta).

6. Você poderá apresentar fezes e urinas avermelhadas após consumir o suco da beterraba. Isso é comum ao consumir este vegetal e não significa saúde prejudicada.

7. Trata-se de um estudo que está testando o efeito do consumo do suco de beterraba sobre indicadores de saúde. Somente no final do estudo poderemos apresentar a presença ou não de algum benefício relacionado ao consumo da beterraba.

8. Todas as etapas do estudo são inteiramente gratuitas sem qualquer relação obrigatória da sua participação até o término do estudo.

9. Você não receberá qualquer tipo de remuneração (ex.: pagamento em dinheiro) pela participação no estudo.

10. As informações coletadas da sua participação na pesquisa serão guardadas com segurança, onde somente de conhecimento dos pesquisadores envolvidos no projeto e dos profissionais

que possam vir a participar da pesquisa, garantindo uma proteção contra qualquer tipo de preconceito ou condenação. Porém, os seus resultados (quaisquer que sejam) serão utilizados somente para esta pesquisa e/ou para fins educacionais (apresentação em aulas, palestras, publicações, congressos e etc.), sem que seu nome seja identificado.

11. Você tem o direito de receber os resultados iniciais da pesquisa.

12. Você terá a direito de não participar do projeto de pesquisa ou de retirar a sua autorização a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer perda ou dano à continuidade de seu tratamento na Instituição, mas deverá notificar os pesquisadores envolvidos, seja pessoalmente, por e-mail ou telefone.

13. Em caso de interrupções ou problemas durante as etapas estabelecidas neste estudo (motivo comprovado), todos os custos serão de responsabilidade da Instituição envolvida (tratamento médico e indenizações legalmente estabelecidas).

14. Você poderá solicitar no final do estudo um relatório com o resultado do seu exame. Tais informações poderão ser úteis para você adotar um melhor estilo de vida.

Em qualquer etapa do estudo ou em caso de dúvidas você poderá contatar o Pesquisador Responsável: Dr. Thiago da Silveira Alvares, telefone: (22) 2762-6313 ou (21) 99989-6554, e-mail: thialvares@gmail.com. E se você tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, no seguinte endereço: Rua Aloísio da Silva Gomes, 50 - Granja dos Cavaleiros, Macaé - CEP: 27930-560; Prédio da FUNEMAC, sala da Coordenação de Pesquisa e Extensão; Telefone: (22) 2796-2552; e-mail: cepufrjmacae@gmail.com

Eu, abaixo identificado, acredito ter recebido informações claras sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com_____, sobre a minha vontade de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são objetivos do estudo, as etapas a serem realizadas, seus incômodos e riscos, as garantias de segurança e de explicação. Ficou claro também que minha participação gratuita e que tenho garantia ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo em participar como voluntário deste estudo e poderei retirar minha autorização a qualquer momento, sem cobranças

ou danos e sem a perda do atendimento nesta Instituição ou de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, tenho conhecimento de que eu e o pesquisador acima informado deveremos rubricar (assinatura abreviada) todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha.

Macaé, _____ de _____ de 201__.

Impressão do dedo

Nome do voluntário	Assinatura do voluntário
Nome do pesquisador responsável	Assinatura do pesquisador responsável
Nome da testemunha (se necessário)	Assinatura da testemunha (se necessário)
Nome da pessoa que obteve o consentimento	Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Anexo 2. Lista dos alimentos que devem ser evitados na véspera das visitas

GPNutMEx
Grupo de Pesquisa em Nutrição e Metabolismo do Exercício

Lista de alimentos que devem ser evitados nos dias antecedentes às avaliações no laboratório.

1. Beterraba.
2. Espinafre.
3. Aipo.
4. Couve.
5. Abóbora.
6. Rúcula.
7. Alface.
8. Cebola.
9. Vagem.
10. Brócolis.
11. Repolho.
12. Tomate.
13. Maça.
14. Uva.

15. Chá Preto.

16. Café.

17. Vinho.

18. Carnes vermelhas (porco, cordeiro, carneiro) e bife de fígado.

19. Queijo e produtos embutidos (exemplo: salsicha).

Anexo 3. Comprovante de submissão do artigo.

A single dose of beetroot juice improves endothelial function but not tissue oxygenation in pregnant women: a randomized clinical trial.

Journal:	*British Journal of Nutrition*
Manuscript ID	BJN-RA-17-1255
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	15-Jan-2018
Complete List of Authors:	Volino-Souza, Mônica; Federal University of Rio de Janeiro, Nutrition Inst. de Oliveira, Gustavo; Federal University of Rio de Janeiro, Nutrition Inst. Alvares, Thiago; Federal University of Rio de Janeiro, Nutrition Inst.
Keywords:	Dietary nitrate, Functional food, Vascular function, Microcirculation, Pregnancy
Subject Category:	Human and Clinical Nutrition

SCHOLARONE™
Manuscripts
For Review Only

Anexo 4. Artigo submetido

A single dose of beetroot juice improves endothelial function but not tissue oxygenation in pregnant women: a randomized clinical trial.

Running title: Beetroot, Pregnancy, vascular function

Mônica Volino-Souza1, Gustavo Vieira de Oliveira1, Thiago Silveira Alvares1

Nutrition and Exercise Metabolism Research Group, Nutrition Institute, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil.

Keywords: Dietary nitrate, functional food, vascular function, microcirculation, pregnancy

*Corresponding author:
E-mail: alvares@macae.ufrj.br (TSA)

Word count: 5023
Number of table: 3
Number of figure: 4

ABSTRACT

Beetroot juice (BJ) consumption has been associated with improved cardiovascular health due increase in nitric oxide (NO) bioconversion. The present study evaluates the effect of BJ consumption on macrovascular endothelial function (FMD) and muscle O2 saturation parameters (StO2) in pregnant women within a randomized, crossover, double-blind design in which twelve pregnant women consumed a single dose (140 mL) of BJ or PLA. Flow-mediated dilation (FMD) was used to evaluate macrovascular endothelial function and near-infrared spectroscopy (NIRS) was used to evaluate muscle StO2 parameters during occlusion and reperfusion phase, which were taken at PRE and 120 and 140 min after BJ/PLA consumption, respectively. Urinary nitrate was assessed before (T0) and 150 min after BJ/PLA consumption. After BJ consumption, urinary nitrate increased compared to T0 (BJ: 0.20 ± 0.13 vs T0: 0.02 ± 0.00, P = 0.000) and PLA intervention (PLA: 0.02 ± 0.00, P = 0.001). FMD improved after BJ consumption when compared to PRE (BJ: 11.00 ± 1.67 vs PRE: 5.53 ± 1.17, P = 0.000) and to PLA (PLA: 5.34 ± 1.31, P = 0.000), whereas there was no improvement in FMD when comparing PLA to PRE (P = 1.000). In StO2 parameters, a difference was not observed after BJ consumption compared to PRE and PLA intervention. The data demonstrates that a single dose of 140 mL of BJ consumption improves macrovascular endothelial function, but not StO2 parameters.

Introduction

During pregnancy, a reduction in macrovascular endothelial function (measured by flow-mediated dilatation – FMD) is associated with hypertensive syndromes, while an increase in FMD reduce the risk of cardiovascular diseases(1). In addition, preserved microvascular endothelial function in pregnancy is necessary for adequate tissue oxygenation. For example, impairments in uteroplacental vascular function in pregnancy lead to increased vascular resistance and decreased blood flow across the placenta, which reduce the placental capacity for nutrient and gas exchange(2). The low oxygen availability may compromise oxygen delivery to the fetus and favor the development of fetal growth restriction (FGR)(3). It is important to point out that nitric oxide molecule (NO) is critically involved in maintaining of high blood flow uteroplacental vasculature in pregnancies, and the reduction of the NO bioavailability has been associated with FGR(2,4,5).

The regulation of vascular tonus varies according to anatomical location (conduit artery or resistance vessel) due to different vascular morphology(6). Measuring FMD is a way of evaluating macrovascular endothelial function in the conduit artery (i.e. brachial artery), while microvascular function (microcirculation) may be evaluated by near-infrared spectroscopy (NIRS), a technology that observes changes in tissue oxygen saturation (StO2), allowing for the evaluation of tissue oxygen extraction (oxidative capacity) and microvascular function (tissue arterioles function) during occlusion and reperfusion period, respectively(7,8).

Beetroot has gained the attention of the scientific community due its beneficial effects on cardiovascular health. The function of beetroot consumption on the risk of cardiovascular diseases has been studied and clinical trials have shown that beetroot is linked to improvement at both the macro- and the microcirculatory levels(7-13). Beetroot has beneficial effects on cardiovascular health because due to the nitrate in its composition. Nitrate can be converted to nitrite in the mouth by action of commensal facultative anaerobic bacteria that expresses nitrate reductase enzymes. In the acidic stomach and with low oxygen availability, nitrite is rapidly converted to NO(8,13-15).

Effects of the beetroot juice (BJ) consumption on macrovascular endothelial function have been studied, demonstrating improvements in endothelial function (by FMD) in elderly people with risk factors for cardiovascular disease (after ingestion a single dose beetroot-

based nutritional gel containing ≈12 mmol nitrate(9)); in healthy subjects after consuming 500 mL of BJ(10); in treated and untreated hypertensive subjects after 28 days of BJ consumption containing ≈6.4 mmol nitrate(11); and in hypercholesterolaemic adult patients after 6 weeks of BJ consumption containing ≈6 mmol nitrate(12). The effects of BJ consumption at microcirculatory levels have also been evaluated by NIRS measurement. In healthy subjects, 6 days of ingestion of BJ containing ≈0.07 mmol nitrate/Kg body promoted an improvement in muscle oxygenation status during submaximal and maximal exercise in severe acute hypoxia(7). Also in healthy subjects, 6 days of 500 mL of BJ consumption containing 11.2 mmol of nitrate promoted an improvement in indexes of muscle oxygenation during exercise(8).

Although there is evidence assessing the effect of BJ consumption on macrovascular function and StO2 parameters, no study in pregnant women has been performed. Therefore, the present study investigated whether a single dose of the BJ would improve FMD and StO2 parameters in pregnant women. It was hypothesized that a single dose of BJ would result in increased NO bioconversion, consequently promoting beneficial changes in the FMD and StO2 parameters in pregnant women.

Methods

Subjects

This study was conducted in accordance with the guidelines set forth in the Declaration of Helsinki and the research ethics committee of the Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Brazil (protocol no. 56732216.5.0000.5699), approved all procedures involving human subjects. The study was registered with Clinical Trials Registry (NCT03315806). All pregnant women gave their written informed consent. Thirty-six pregnant women were recruited through announcements in flyers and advertisements during community events in the Macaé City, Rio de Janeiro Estate, Brazil; 24 recruits withdrew for personal reasons or were ineligible according to the inclusion criteria; and twelve recruits were randomized (Figure 1). Pregnant women were selected if between 20 and 35 weeks of gestation and were over 18 years old. Exclusion criteria included the presence of diabetes mellitus and gestational diabetes, hypertensive syndromes, HIV positive, liver or kidney

disease, beetroot allergy, use of antioxidants and medicament that alter endothelial function (angiotensin converting enzyme inhibitor), use of antibiotics up to 2 weeks before the visits and using.

Study design

A randomized, double-blind, crossover and placebo-controlled study was conducted from October 2016 to May 2017. All subjects reported to the Dynamic Vascular Laboratory of Federal University of Rio de Janeiro, Macaé City, Brazil, on three occasions, with at least 1-week interval between visits. The first visit was used to register basal (PRE) macro- and microvascular function measurements, blood sample collection for the characterization of pregnant women, followed by randomization (2:1 BJ:PLA). The BJ production requires several steps, including sanitation, centrifugation, pasteurization and portioning. Production of small quantities of BJ for only one pregnant women was impracticable because it requires considerable time for production. In the randomization 1:1, the remaining BJ would be lost since no preservatives were added, hence its short shelf life. Furthermore, it is important to point out that refrigerating (at 4 ºC) and freezing (at -20 oC) the juice for one week could reduce the nitrate content by 15% and 14%, respectively(16). Thus, randomization 2:1 (BJ:PLA) was more convenient in guaranteeing no nitrate losses. The participants were randomized and assigned by laboratory staff to ensure blind measurement. In the second and third visit, sample urine was drawn before (T0) BJ or PLA consumption. Afterwards, macrovascular endothelial function, StO2 parameters and urine samples were collected, respectively, at 120 min (T120), 140 min (T140) and 150 min (T150) after BJ or PLA consumption (Figure 2). The three visits were held between 07:00 and 12:00 a.m. The participants were instructed to fast for at least 8 hours before each visit; to restrict carbonated mineral water; to avoid the intake of foods rich in nitrate and nitrite; to not use any mouthwash; to not consume coffee or teas; and not to exercise for at least 12 hours before the visits.

Beetroot/placebo juice preparation

The beetroots (Beta vulgaris L.) were washed in tap water, sanitized with a chlorine solution and centrifuged (Model CE700, Black & Decker, Baltimore, MD). The resulting juice was pasteurized, and 140 ml juice were distributed in two bottles of dark color. For preparation of the placebo (control nitrate-depleted juice), the nitrate was removed from BJ by using a specific anion-exchange resin A-520E (Purolite®, BalaCynwyd, PA). The content of nitrate of the BJ and PLA consumed by the subjects of the present study were 8.95 ± 0.28 mM/140 mL and 0.27 ± 0.02 mM/140 mL, respectively.

Urinary Nitrate

Nitrate analysis in urine was performed as previously described by Croitoru (2012) by using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. 100 µL of sample was added to 100 µL of acetonitrile (v:v) and centrifuged (10 min at 14.000 rpm) for desproteinization. Thereafter, 150 µL of supernatant was mixed with 150 µL of mobile phase (v:v) (5 mM tetrabutylammonium hydroxide) and the solution was mixed. Finally, 150 µL was injected in HPLC. Sodium nitrate was used for quantification, and the results were expressed as mmol·mmol−1 creatinine for nitrate.

Macrovascular endothelial function analysis

The evaluation of the FMD was performed in quiet air-conditioned room (constant temperature of 22-25 °C) 120 min (T120) after BJ/PLA consumption. All examinations were conducted by the same investigator. Pregnant women rested quietly with an angle of 90º between femur and trunk. Endothelial function was assessed in accordance with Oliveira et. al.(9). FMD is calculated as the percentage dilated at the maximum peak brachial artery diameter (PBD) after cuff deflation, relative to maximum baseline brachial artery diameter (BBD). All analyses were conducted by a single investigator who was blinded to the participant and supplementation order. Coefficient of variation was intraday 5.1 ± 0.31% and interday 5.1 ± 0.12%.

StO2 parameters analysis

Changes in tissue oxygen saturation (StO2) was by a near-infrared spectroscopy (NIRS) device (PortaMon, Artinis, Medical Systems) that was placed on the flexor muscles of each subject's dominant forearm. After the StO2 signals had been stable for 30 seconds, the cuff was rapidly inflated to suprasystolic levels (i.e.: 250 mm Hg), to obstruct blood flow to forearm muscles and a 5-minute arterial occlusion was performed. The reperfusion phase after cuff release was recorder for more 2 min. During all tests, the NIRS system was connected to a personal computer via Bluetooth for data acquisition (10Hz), analogue-to-digital conversion and subsequent analysis of the raw data (i.e. no filter was used) using native software (Oxysoft version 2.1.6; Artinis Medical Systems). The software calculates absolute changes in light absorption at the different wavelengths (750 and 850 nm) of oxyhaemoglobin (O2Hb) and deoxyhemoglobin (HHb) using the spatially resolved spectroscopy method. StO2 was calculated as [O2Hb / O2Hb + HHb]*100. The following NIRS parameters were considered for statistical analysis: Baseline StO2 (StO2 base), which represent the average of 30 seconds of StO2 prior to arterial occlusion; Desaturation rate (StO2 slope_1), which correspond to the slope of StO2 (the rate of change in StO2 per time) during the arterial occlusion phase; Minimum StO2 (StO2 min), which correspond to the lowest StO2 value during the arterial occlusion phase; Resaturation rate (StO2 slope_2), which correspond to the slope of StO2 during the reperfusion phase; Maximal StO2 (StO2 max), which corresponds to the highest SmO2 value during the reperfusion phase; Time to maximal StO2 (StO2 tmax), which corresponds to the time to reach the StO2 max.

Statistical Analysis

An a priori power analysis was conducted (G*Power v. 3.0.1) for an F test (ANOVA, repeated measures, within factors). On the basis of a statistical power ($1 - \beta$) of 0.80, an effect size of 0.35, and an overall level of significance of 0.05, at least 16 participants were needed to detect a statistical difference. Although the present study was unable to achieve the sample size, previous studies have observed statistical difference in StO2 parameters with $\leq$ 12 volunteers after beetroot supplementation(8,9,18).It is important to point out that the pregnant women recruited in the present study are a specific group with homogeneous characteristics. Furthermore, due to the high specificity and physiological changes inherent in pregnancy,

such as seasickness and vomiting, as well as to the protocol of the study that requires periods of fasting, it was hard to reach a large sample size.

The normality and homogeneity of variances of the data were examined with the Shapiro-Wilk and Mauchly tests, respectively, and were violated only for StO2base. To identify differences in the FMD and StO2 parameters between PRE, PLA and BJ interventions a repeated-measures one-way ANOVA was performed. When the assumption of normality and homogeneity of variances were violated, a Friedman test was used. To identify differences in the in nitrate urinary between BJ and PLA a two-way ANOVA was used. Statistical significance was set at the 0.05 level of confidence. All analyses were performed using a commercially available statistical package (IBM SPSS Statistics version 23 for Mac, Chicago, IL) and the results were expressed as means ± standard deviation (SD).

Results

Of the thirty-six assessed for eligibility, twelve (33%) were randomized and completed the study (figure 1). Furthermore, the StO2 data of one pregnant women had to be excluded due to technical reasons regarding NIRS signal lost. Therefore, only eleven volunteers were considered for analysis of this variable. The baseline volunteers' characteristics are shown in Table 1.

Urinary nitrate

T0 values of urinary nitrate (mmol·mmol−1 creatinine) were not different between groups (PLA: 0.02 ± 0.00 vs BJ: 0.02 ± 0.00, P = 0.866). A significant main effect for time was observed (P = 0.001). Post hoc test revealed that urinary nitrate increased 10-fold in T150 after BJ consumption compared to T0 (T150: 0.20 ± 0.13 vs T0: 0.02 ± 0.00, P = 0.000), but not for PLA consumption compared to T0 (T150: 0.02 ± 0.00 vs T0: 0.02 ± 0.00, P = 0.992). Furthermore, there was a significant treatment x time interaction effect for urinary nitrate (P = 0.001). Post hoc test revealed that urinary nitrate increased 10-fold in T150 after BJ consumption compared to PLA (P = 0.001).

Endothelial function

The endothelial function parameters are shown in Fig. 3 and Table 2. FMD (%) 2-fold increased after BJ consumption (11.00 ± 1.67) compared to PLA (5.34 ± 1.31) and PRE (5.53 ± 1.17). There were no changes on BBD and PDB after BJ compared to PRE and PLA. In addition, there was no effect on the supplementation order (BJ PLA vs. PLA BJ) for FMD (P = 0.547), BBD (P = 0.673) and PDB (P= 0.658).

Microvascular function

The microvascular function parameters are showed in Fig. 4 and Table 3. There no changes in StO2 base, StO2 slope_1, StO2 min, StO2 slope_2, StO2 max and StO2 tmax after BJ compared to PRE and PLA. In addition, there was no effect on the supplementation order (BJ PLA vs. PLA BJ) for base (P = 0.784), StO2 slope_1 (P = 0.720), StO2 min (P= 0.784), StO2 slope_2 (P= 0.518), StO2 max (P= 0.671) and StO2 tmax (P= 0.386).

Discussion

The aim of this study was to examine the effects of a single dose of a BJ on macrovascular endothelial function FMD and StO2 parameters in pregnant women. This is the first investigation into the effects of the single dose of beetroot juice on FMD and StO2 parameters (StO2 base, StO2 min, StO2 Slope_1, StO2 max, StO2 slope_2 and StO2 Tmax) in pregnant women. The major finding of this study is that single dose of a BJ improves FMD in pregnant women.

FMD is a noninvasive test of endothelial function, and changes in FMD values provide important prognostic information(19). FMD technique promotes increased in blood flow and vasodilation due changes in shear stress and this phenomenon is mediated by release of NO. Subjects with cardiovascular diseases have lower FMD values (endothelial dysfunction) while increased FMD decrease the risk of cardiovascular disease(1). Low FMD values in pregnancy are associated with health complications of the mother and fetus, such as preeclampsia and FGR. It has been shown that pregnant women who developed preeclampsia and FGR have shown FMD values of 3.5 and 6.2%, respectively, while pregnant women who did not

develop preeclampsia and FGR presented FMD values of 8%(3). The authors concluded that endothelial function is impaired in pregnant women who develop preeclampsia and FGR. In the present study, although the pregnant women did not develop preeclampsia and/or FGR, a low baseline FMD (5%) was observed, suggesting impaired endothelial function. After BJ consumption, the FMD values increased from 5% to 11% (meaning a 110% of increase), thereby reaching FMD values similar to pregnant women who did not develop preeclampsia and FGR(3).

The results of FMD in the present study are in accordance with previous findings(9,11,20). Oliveira et al.(9) found improvements on FMD after ingestion of single dose of beetroot-based nutritional gel rich in nitrate (containing ≈12 mmol nitrate in 100g) in the elderly with risk factors for cardiovascular disease. Kapil et al.(11) demonstrated increased FMD after 28 days of ingestion of 250 mL of BJ (containing ≈6.4 mmol of nitrate in 250 mL) in hypertension subjects. Asgary et al.(20) observed improvements on FMD after 2 weeks of consumption of 250 mL of BJ and 250g of cooked beet in hypertensive subjects. Therefore, the results of these studies suggest that the effect of a single dose of BJ on FMD may be the same regardless of the population studied.

Increase in urinary nitrate is in accordance with previous findings(9,21). Baião et al.(20) demonstrated an increase in urinary nitrate concentration via bioconversion after ingestion of single dose of 100 mL of BJ (containing ≈1.6 mmol of nitrate). Oliveira et al.(9) showed an increase in urinary nitrate concentration after ingestion of single dose of beetroot-based nutritional gel rich in nitrate (containing ≈12 mmol nitrate in 100g). Siervo et al.(22) showed increase in nitrate concentration after ingestion of 140 mL of BJ (containing 12 mmol of nitrate) during 7 days.

StO2 parameters during arterial occlusion period (StO2min and StO2 Slope_1) provide information about tissue oxygen extraction(23). Dipla et al.(24) evaluated recently StO2 parameters during arterial occlusion in pregnant women with gestational diabetes mellitus (GMD). In GMD, the StO2min value was greater when compared to control group of pregnant women (≈ 55% for GMD and 40% for control), suggesting that the GMD group exhibited a reduced capacity for O2 extraction at the skeletal muscle level. In the present study, pregnant women demonstrated a StO2 min value near the GMD group in the Dipla et al(24) study, suggesting that the pregnant women in present study possibly presented an

impaired capacity for O2 extraction. It is already known that elevated blood glucose increases cell oxidative stress(25,26), which impairs oxygen extraction by tissues (mitochondrial dysfunction)(27) . In the present study, the pregnant women presented normal blood glucose (<100 mg/dL); however, they presented elevated cholesterol (> 5mmol/L). Elevated blood cholesterol has been shown to be associated with increased oxidative stress(28), such as elevated blood glucose, which also impairs oxygen extraction by tissues(25,26). Additionally, a significant correlation between StO2min and cholesterol (date not showed) was observed, which may explain the greater StO2min value in pregnant. It was expected that BJ consumption would improve StO2 parameters during arterial occlusion due to the effect of nitrate on mitochondrial function. Nitrate-nitrite-NO pathway has been shown to modulate O2 consumption in mitochondria(29). In complex IV of electron transport chain, NO competes with O2 for Cytochrome C Oxidase (COX), whereby NO binds to COX when oxygen is available(29). However, no changes were observed in StO2 parameters during arterial occlusion. Bioconversion of nitrite to NO requires approximately 50% haemoglobin-saturated oxygen(30). The present study observed approximately 53% haemoglobin was saturated with oxygen, which indicates that the environment was favorable for nitrite-to-NO bioconversion, although no significant difference was observed in muscle oxygen extraction.

During reperfusion phase, StO2 parameters (StO2 max, StO2 slope_2 and StO2 tmax) reflect the ability of recruiting greater arteriole numbers(31). After arterial desocclusion, there is an increase in blood flow in the ischemic limb, which promotes increased in vasoactive substances(32). An improvement in StO2 parameters after BJ consumption due vasodilator propriety of NO had been expected. However, there was no significant difference in StO2 parameters after BJ consumption. The StO2 max and StO2 slope_2 in the present study was near the control group (healthy pregnant) values in Dipla et al(24) study, suggesting that pregnant women present a sufficient ability to recruit greater arteriole numbers. Hence, the integrity of microvascular reactivity in pregnant women in the present study may be a possible reason for the neglible effect on these parameters after BJ consumption. It was speculated that NO should be delivered only to the areas with impaired microvascular perfusion to avoid diffuse dilation in perfused capillaries. As microvascular reactivity is preserved in pregnant women of the present study, the capillaries are sufficiently perfused and do not require increase in perfusion.

In addition, the differences among the responses observed in macro- and microcirculatory levels after BJ consumption can be explain by cell heterogeneity. Differences in endothelial cells are reported at level morphology, function, gene expression and antigen composition(6). Furthermore, endothelial cell exhibit differences depending on where the type of vessel or organ is located(33). Therefore, NO action seems to be different in macro- and microvasculature.

In summary, the effect of a single dose of BJ consumption, a source of dietary nitrate, on macrovascular endothelial function and StO2 parameters was investigated. The results of the present study show that BJ improves macrovascular endothelial function, but not StO2 parameters. Furthermore, BJ consumption increase urinary nitrate. The beneficial effect on macrovascular endothelial function observed after BJ consumption may be an important nutritional intervention for pregnant women aiming to reduce the risk of developing cardiovascular disease. However, future studies are necessary to address and evaluate the effects of BJ consumption on vascular complications during pregnancy.

Acknowledgments

The authors thank Ricky Toledano for preparing the English version of the manuscript. This work was supported by the Research Foundation of the State of Rio de Janeiro – FAPERJ (process no.: E-26/111.297/2013 and E-26/110.309/2014). Funding was also provided from The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (process no.: 442977/2014-0).

Author contributions

MVS and GVO contributed to volunteers' recruitment and physiological analysis. TSA contributed reviewing the manuscript. MVS contributed substantially to data acquisition, statistical analysis and data interpretation, and was the manuscript writer. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this manuscript.

References

1. Green DJ, Jones H, Thijssen D, Cable NT, et al. (2011) Flow-mediated dilation and cardiovascular event prediction: does nitric oxide matter? Hypertension 57, 363-369.

2. Cottrell E, Tropea T, Ormesher L, et al. (2017) Dietary interventions for fetal growth restriction - therapeutic potential of dietary nitrate supplementation in pregnancy. J Physiol, 595, 5095-5102.

3. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, et al. (2003) Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. Lancet 361, 1511-7.

4. Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniuguir A, et al. (2013) Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. Placenta 34, 20-28.

5. Chaddha V, Viero S, Huppertz B, et al. (2004) Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. Semin Fetal Neonatal Med 9, 357-369.

6. Aird WC. (2012) Endothelial cell heterogeneity. Cold Spring Harb Perspect Med 2, 1-3.

7. Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, et al. (1985) Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. 113, 736-745.

8. Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, et al. (2009) Dietary nitrate supplementation reduces the O2 cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. J Appl Physiol 107, 1144-1155.

9. Oliveira GV, Morgado M, Pierucci AP, et al. (2016) A single dose of a beetroot-based nutritional gel improves endothelial function in the elderly with cardiovascular risk factors. J Funct Foods 26, 301–308.

10. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, et al. (2008) Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. Hypertension 51, 784-790.

11. Kapil V, Khambata RS, Robertson A, et al. (2015) Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. Hypertension 65, 320-327.

12. Velmurugan, S, Gan, JM, Rathod, KS, et al. (2016) Dietary nitrate improves vascular function in patients with hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo controlled study. Am J Clin Nutr 103, 25–38.

13. Bakker E, Engan H, Patrician A, et al. (2015) Acute dietary nitrate supplementation improves arterial endothelial function at high altitude: A double-blinded randomized controlled cross over study. Nitric Oxide 29, 58-64.

14. Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, et al. (2009) Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. Nat Chem Biol 5, 865-869.

15. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. (2015) Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. Nat Rev Drug Discov, 14, 623-641.

16. Corleto KA, Singh J, Jayaprakasha GK, et al. (2018) Storage Stability of Dietary Nitrate and Phenolic Compounds in Beetroot (Beta vulgaris) and Arugula (Eruca sativa) Juices. J Food Sci, 1-12.

17. Croitoru MD. (2012) Nitrite and nitrate can be accurately measured in samples of vegetal and animal origin using an HPLC-UV/VIS technique. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 911, 154-161.

18. Horiuchi M, Endo J, Dobashi S, et al. (2017) Muscle oxygenation profiles between active and inactive muscles with nitrate supplementation under hypoxic exercise. Physiol Rep 5, 1-6.

19. Harris RA, Nishiyama SK, Wray, DW. (2010) Ultrasound Assessment of Flow-Mediated Dilation. Hypertension 55, 1075-1085.

20. Asgary S, Afshani MR, Sahebkar A, et al. (2016) Improvement of hypertension, endothelial function and systemic inflammation following short-term supplementation with red beet (Beta vulgaris L.) juice: a randomized crossover pilot study. J Hum Hypertens 30, 627-632.

21. Baião D, Conte-Junior CA, Paschoalim VM, et al. (2016) Beetroot juice increase nitric oxide metabolites in both men and women regardless of body mass. Int J Food Sci Nutr 67, 40-46.

22. Siervo M, Oggioni C, Jakovljevic DG, et al. (2016) Dietary nitrate does not affect physical activity outcomes in health older adults in a randomized, crossover trial. Nutr Res 36, 1361-1369.

23. Kolb L, Orbegozo D, Creteur J, et al. (2017) Oral Nitrate Increases Microvascular Reactivity and the Number of Visible Perfused Microvessels in Healthy Volunteers. J Vasc Res 54, 209-216.

24. Dipla K, Triantafyllou A, Grigoriadou I, et al. (2017) Impairments in microvascular function and skeletal muscle oxygenation in women with gestational diabetes mellitus: links to cardiovascular disease risk factors. Diabetologia 60, 192-201.

25. Asmat U, Abad K, Ismail K. (2016) Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review Saudi Pharm J. 24, 547-553.

26. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, et al. (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. Biochim Biophys Acta, 1840, 2709-29.

27. Pedersen BL, Baekgaard N, Quistorff B. (2009) Muscle mitochondrial function in patients with type 2 diabetes mellitus and peripheral arterial disease: implications in vascular surgery. Eur J Vasc Endovasc Surg, 38, 356-64.

28. Rasool AH, Abdul Rahman AS, Abd Ghaffar NA, et al. (2010). Abnormal microvascular reactivity with hypercholesterolaemia in pregnancy. Malays J Med Sci, 17, 14-9.

29. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, et al. (2011) Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. Cell Metab 13, 149-159.

30. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. (2008) The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 7, 156-67.

31. Ryan TE, Brophy P, Lin CT, et al. (2014) Assessment of in vivo skeletal muscle mitochondrial respiratory capacity in humans by near-infrared spectroscopy: a comparison with in situ measurements. J Physiol 592, 3231-3241.

32. Engelke KA, Halliwill JR, Proctor DN, et al. (1996) Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in human forearm. J Appl Physiol 81, 1807-1814.

33. Potente M, Mäkinen T. (2017) Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 18, 477-494.

Tables

Table 1. Baseline demographic and clinical characteristic.

Variable		
Demographics	**Mean**	**SD**
N	12	
Age (years)	27	6.51
Gestational age (weeks)	25.6	6.24
Body mass (kg)	79.14	20.20
Body mass index (kg/m²)	29.3	7.04
Forearm adipose tissue thickness (mm)	2.17	0.83
Biochemistry		
Total cholesterol (mmol/L)	6.52	1.04
Glucose (mg/dl)	76.3	9.76
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.58	0.34
LDL-cholesterol (mmol/L)	4.12	0.87
TG (mmol/L)	1.78	0.37
TG/HDL-cholesterol (mmol/L)	1.15	0.28
Log(TG/HDL-cholesterol) (mmol/L)	0.05	0.10
Clinical		
SBP (mm Hg)	102.88	6.27
DBP (mm Hg)	70	6.63
HR	82.5	8.04

TG = triglycerides, SBP = systolic blood pressure, DBP = diastolic blood pressure, HR = heart rate.

Table 2. Macrovascular endothelial function parameters at baseline and after BJ and PLA consumption (Mean values with their standard errors)

	PRE		PLA		BJ		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	*f*
FMD (%)	5.53	1.17	5.34	1.31	11.00***	1.67	1.95
BBD (mm)	3.39	0.63	3.34	0.50	3.28	0.66	0.07
PBD (mm)	3.56	0.66	3.52	0.53	3.58	0.81	0.03

FMD, flow-mediated dilation; BBD, maximum baseline brachial artery diameter; PBD, maximum peak brachial artery diameter.

f, Cohen f.

***Statistical difference compared to PRE and PLA. (P<0.001); one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test).

Table 3. StO_2 parameters at baseline and after BJ and PLA consumption (Mean values with their standard errors)

	PRE		PLA		BJ		*P*	*f*
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
$StO_{2\ base}$ (%)	71.39	8.97	69.69	4.25	71.19	5.81	0.336	0.11
$StO_{2\ slope_1}$ (% s^{-1})	-0.52	0.30	-0.60	0.32	-0.58	0.29	0.908	0.07
$StO_{2\ Min}$ (%)	54.10	13.03	52.83	12.99	53.37	12.41	0.973	0.14
$StO_{2\ slope_2}$ (% s^{-1})	1.03	0.65	1.03	0.55	1.06	0.72	0.993	0.00
$StO_{2\ Max}$ (%)	78.96	3.04	79.63	1.18	80.15	3.56	0.985	0.18
$StO_{2\ tmax}$ (s)	49.28	17.84	43.06	8.43	43.43	11.68	0.475	0.22

$StO_{2\ base}$, baseline StO_2; $StO_{2\ slope_1}$, desaturation rate; $StO_{2\ min}$, minimum StO_2; $StO_{2\ slope_2}$, resaturation rate; $StO_{2\ Max}$, maximal StO_2; $StO_{2\ tmax}$, time to maximal StO_2.

f, Cohen f.

One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test).

Figures

Figure 1. Schematic of participant recruitment of the study.

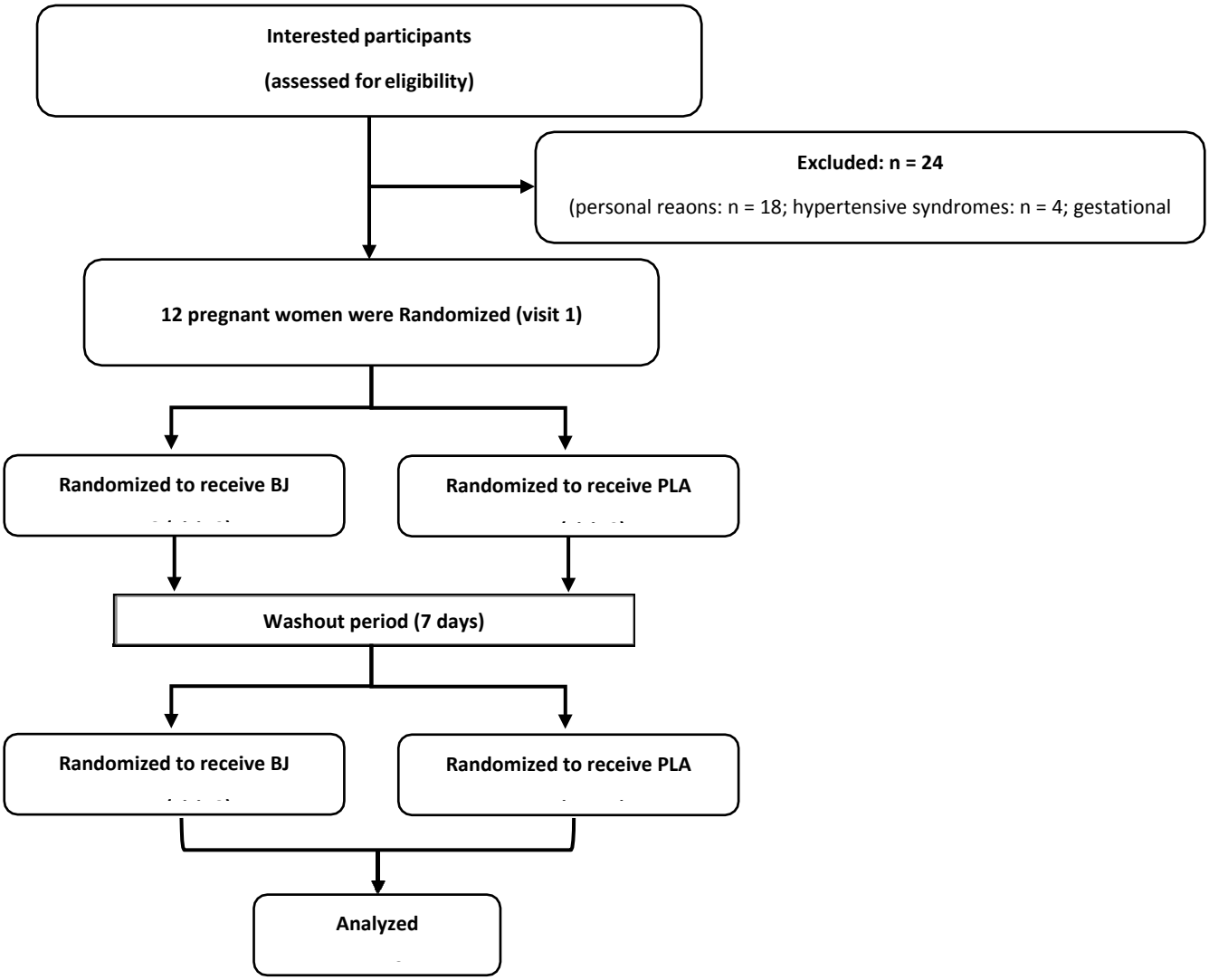

Figure 2. Experimental design.

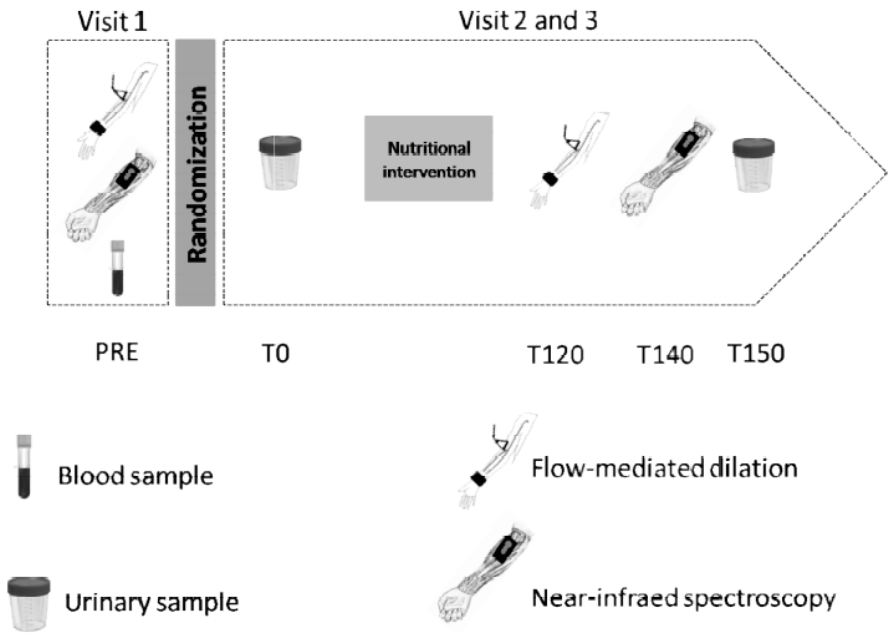

Figure 3. Mean FMD after beetroot juice (BJ) and placebo (PLA) intervention. Values are means and standard deviations. *** denotes significant difference for PLA. ** p<0.001.

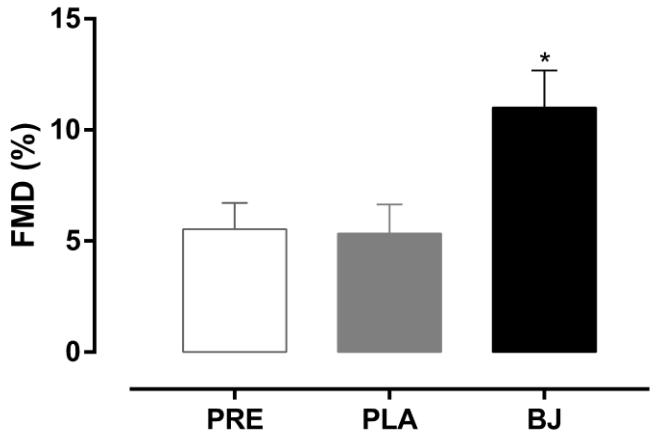
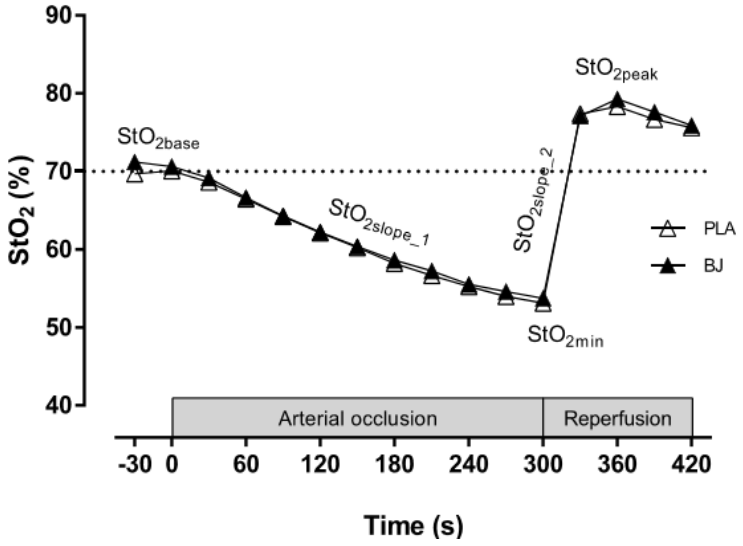
Figure 4. Near-infrared spectroscopy-derived profile of typical comportment of forearm muscle O2 saturation (StO2, %) and the parameters evaluated.