Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

JÉSSICA MARIA SANCHES LOPES

**Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica nas
respostas cardiovasculares à suplementação
alimentar com nitrato de sódio**

Ribeirão Preto - SP

2021

JÉSSICA MARIA SANCHES LOPES

**Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica nas
respostas cardiovasculares à suplementação
alimentar com nitrato de sódio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos

Ribeirão Preto - SP

2021

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sanches-Lopes, Jéssica Maria

Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica nas respostas cardiovasculares à suplementação alimentar com nitrato de sódio. Jéssica Maria Sanches Lopes.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos.
Ribeirão Preto, 2021. 113f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANCHES-LOPES, Jéssica Maria. **Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica nas respostas cardiovasculares à suplementação alimentar com nitrato de sódio.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.:
Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:
Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:
Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:
Instituição:

Assinatura: _____

À minha avó Maria que tanto sonhou em me ver Doutora e hoje mora no céu. O céu está em festa.

Àqueles que estão sempre ao meu lado sendo minha fortaleza, meus amados pais Rosemeire e Manoel e meu irmão João Manoel.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida pelo dom da vida, pela força para seguir meus sonhos e por sempre me guiarem pelos melhores caminhos com sabedoria e discernimento.

Aos meus pais por tudo. Obrigada pela educação, amor, cuidado, por não medirem esforços para unir nossa família, estar presente, me dar forças e suporte para continuar. Ao meu irmão que divide a vida comigo, vive minhas felicidades, acalma meu choro e alegra meus dias. Vocês são meu amor e minha fortaleza.

À minha avó Maria (*in memoriam*) que sempre esteve comigo, cuidou, amou e hoje é uma estrelinha que intercede a Deus e Nossa Senhora por mim. Meu avô Antônio, meus tios e primos, em especial minhas tias Zi e Zô por todo o amor e por me acolherem como filha e aos meus padrinhos por todo carinho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos que me orienta desde o mestrado de forma honesta e tranquila. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e enxergar a grandeza da pesquisa clínica, eu sou muito grata por isso. Obrigada por todas as conversas, apoio, dedicação, conselhos e por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Wilson Salgado Junior por participar da idealização desse estudo, pelo suporte durante a execução e por ter me colocado em contato com as voluntárias da cirurgia bariátrica durante o recrutamento.

Ao Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho pelo auxílio com o equipamento MAPA, treinamentos e discussões durante o desenvolvimento do projeto.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Carla, Grazi, Indiara, Juliana, Leevan, Rose, Renato, Thais, Evandro, Tiago e Dani pelos conselhos, pelas ideias, ensinamentos, pela ótima convivência diária e por fazerem meus dias mais leves. A Rose, Renato e Carla por serem muito mais que colegas de laboratório. Muito obrigada pela amizade e companheirismo diário, por me ouvirem, me ajudarem, secarem minhas lágrimas e darem boas risadas comigo. A Sandra pelo excelente apoio técnico, suporte, carinho e alto astral.

A minha aluna de Iniciação Científica, por estar comigo desde a inclusão dos primeiros voluntários, por todo o apoio, risadas, companheirismo, por me dar a oportunidade de ensinar e por sempre me encorajar.

Ao querido prof. Dr. Cleber Ramos (*in memoriam*), por ter despertado em mim o amor pela farmacologia. Você concretizou sua missão como educador.

A equipe da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) por toda a generosidade e me ajudarem na condução desse projeto.

As voluntárias desse estudo que acreditaram em mim e sobre tudo na ciência, toda a minha admiração e respeito por vocês.

A todas as amigas que cultivei em Ribeirão Preto desde minha vinda ao Curso de Inverno em Farmacologia: Nicole, Alice, Aline, Flavio, Pedro, Mayara, Leandro, Natanne, Fran, Mel. Muitos já seguem seus vôos longes, mas se fazem presentes de uma forma muito especial, meu muito obrigada por tudo. Em especial ao Gustavo e Airton que foram fundamentais para o início da minha trajetória em Ribeirão Preto, muito obrigada pela amizade linda que temos.

Aos meus amigos da faculdade, Gabriela Maria, Jefferson, Murillo e Camila por sempre me fazerem rir, mesmo quando estou chorando, pela amizade, apoio e pelo suporte emocional.

Aos meus amigos promissenses Ananda, Carol, Alison e Jéssica por me incentivarem, me mostrarem que a distância não é limite para a amizade e por fazerem parte da minha família.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial à Gislaine e ao Ramon, sempre extremamente atenciosos e prestativos. Obrigado por tudo o que fizeram por mim durante este período.

A todos os professores que tive, ao longo da vida, por todo ensinamento.

A todas as pessoas que passaram pelo meu caminho e não foram citadas, mas que sentem carinho por mim, obrigada por terem participado de algum momento da minha vida e me ajudado a construir a pessoa que sou hoje.

Aos professores da banca examinadora, agradeço a disponibilidade e participação na banca.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio e suporte à pesquisa nacional.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

*“Se quiser triunfar na vida,
faça da perseverança a sua melhor amiga;
da experiência, o seu conselheiro;
da prudência, o seu irmão mais velho;
e da esperança, o seu anjo da guarda.”*

Joseph Addison

Resumo

SANCHES-LOPES, Jéssica Maria. **Alterações induzidas pela cirurgia bariátrica nas respostas cardiovasculares à suplementação alimentar com nitrato de sódio**. 2021. 113f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O nitrito e o nitrato inorgânico podem ser reduzidos a NO e espécies relacionadas ao NO como os S-nitrosotióis pela via nitrato-nitrito-NO. Isto ocorre devido à redução do nitrato a nitrito pela ação de bactérias na boca e a redução do nitrito a NO dependente do pH ácido do estômago ou por enzimas com atividade nitrito-redutase. O ambiente ácido do estômago possui grande importância na formação de NO e S-nitrosotióis e diversos estudos sugerem que alteração no pH gástrico podem afetar essa conversão. Nesse contexto, a cirurgia bariátrica, por alterar a anatomia do estômago e aumentar o pH gástrico, pode afetar a via nitrato-nitrito-NO e alterar o efeito anti-hipertensivo e antioxidante do nitrato de sódio. Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar o efeito do extrato de beterraba, contendo nitrato de sódio, em pacientes que passaram pela cirurgia bariátrica ou não. Foram incluídos voluntários que realizaram a cirurgia bariátrica de Y em Roux há mais de 1 ano e meio e voluntários controles, sendo estes pacientes que não realizaram a cirurgia bariátrica. Esses pacientes receberam durante 14 dias, por via oral, extrato de beterraba (0,1 mmol de nitrato / kg / dia) e tiveram a pressão arterial avaliada pelo MAPA, a função endotelial pelo endopat e a rigidez vascular pela velocidade da onda de pulso (VOP). Foram realizadas coletas de sangue e de saliva, antes e após a suplementação. As concentrações de nitrito, nitrato, S-nitrosotiol (RSNO) e espécies nitrosiladas (RSNO) no plasma e saliva foram avaliados por quimioluminiscência. Foram avaliados marcadores circulantes de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante total plasmática. A suplementação com nitrato de sódio resultou em diminuição da pressão arterial sistólica, pressão arterial média e frequência cardíaca no grupo controle e não alterou a pressão do grupo cirurgia bariátrica. Foi observada melhora na função endotelial no grupo controle e o mesmo não ocorreu no grupo cirurgia bariátrica, após a suplementação. Esses resultados funcionais ocorreram em paralelo com o aumento da concentração plasmática e salivar de nitrato e nitrito. Além disso, resultou no aumento da concentração de

RSNO e RXNO no plasma e na saliva de indivíduos controles e diminuição dessas no plasma do grupo cirurgia. Na saliva foi observado um aumento de RSNO e RXNO no grupo cirurgia, porém foi menor que o encontrado no grupo controle. A suplementação com nitrato também reduziu o estresse oxidativo e aumentou a capacidade antioxidante total no grupo controle e esse efeito não foi observado no grupo cirurgia. Juntos, esses achados clínicos demonstram que a cirurgia bariátrica altera a via nitrato-nitrito-NO, impedindo os efeitos de redução da pressão arterial, melhora da função endotelial e estresse oxidativo promovidos pela suplementação com nitrato de sódio em indivíduos que apresentam a área estomacal preservada. Também reforçam a importância do pH gástrico no efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio e na homeostase cardiovascular.

Palavras chave: nitrato, anti-hipertensivo; S-nitrosotióis, pH gástrico, cirurgia bariátrica

ABSTRACT

SANCHES-LOPES, Jessica Maria. **Bariatric surgery-induced changes in cardiovascular responses to dietary supplementation with sodium nitrate.** 2021. 113f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Inorganic nitrite and nitrate can be reduced to NO and NO-related species such as S-nitrosothiols via the nitrate-nitrite-NO pathway. This is due to the reduction of nitrate to nitrite by the action of bacteria in the mouth and the reduction of nitrite to NO depending on the acidic pH on the stomach or by enzymes with nitrite-reductase activity. The acidic environment of the stomach is very important to the formation of NO and S-nitrosothiols and several studies suggest that changes in gastric pH can affect this conversion. In this context, bariatric surgery, by altering the anatomy of the stomach and increasing gastric pH, can affect the nitrate-nitrite-NO pathway and change the antihypertensive and antioxidant effect of sodium nitrate. Therefore, the aim of this study was to compare the effect of beet extract, containing sodium nitrate, in patients who had bariatric surgery or not. Volunteers who had bariatric surgery of Y in Roux for more than 1 year and a half and control volunteers were included, these being patients who did not had bariatric surgery. These patients received for 14 days, orally, beet extract (0.1 mmol nitrate / kg / day) and had blood pressure assessed by ABPM, endothelial function by endopat, and vascular stiffness by pulse wave velocity (PWV). Blood and saliva were collected before and after supplementation. The concentrations of nitrite, nitrate, S-nitrosothiol (RSNO) and nitrosylated species (RSNO) in plasma and saliva were evaluated by chemiluminescence. Circulating markers of oxidative stress and plasma total antioxidant capacity were evaluated. Supplementation with sodium nitrate resulted in a decrease in systolic blood pressure, mean blood pressure and heart rate in the control group and did not change the pressure in the bariatric surgery group. Improvement in endothelial function was observed in the control group and the same did not occur in the bariatric surgery group, after supplementation. These functional results were associated with increases in the plasma and salivary concentration of nitrate and nitrite. Furthermore, it resulted in an increase in the concentration of RSNO and RXNO in plasma and saliva of control subjects and a decrease in these in

the plasma of the surgery group. In saliva, an increase in RSNO and RXNO was observed in the surgery group, but it was lower than that found in the control group. Nitrate supplementation also reduced oxidative stress and increased total antioxidant capacity in the control group and this effect was not observed in the surgery group. Together, these clinical findings demonstrate that bariatric surgery alters the nitrate-nitrite-NO pathway, preventing the effects of lowering blood pressure, improving endothelial function and oxidative stress promoted by sodium nitrate supplementation in individuals with preserved stomach area. In addition step up the importance of gastric pH in the antihypertensive effect of sodium nitrate and in cardiovascular homeostasis.

Keywords: nitrate, antihypertensive; S-nitrosothiols, gastric pH, bariatric surgery

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1 Via nitrato-nitrito-NO em humanos .	27
Figura 2 Modelo cirúrgico Bypass gástrico em Y de Roux	36
Figura 3 Pressão arterial sistólica nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	58
Figura 4 – Pressão arterial diastólica nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica.	60
Figura 5 – Pressão arterial média nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	62
Figura 6 – Frequência cardíaca nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	64
Figura 7 – Endopat pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	66
Figura 8 – VOP pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	67

Figura 9 – Nitrato plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	69
Figura 10 – Nitrito plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	70
Figura 11 – RSNO e RXNO plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica.....	72
Figura 12 – RNNO plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	73
Figura 13 – Nitrato salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	74
Figura 14 – Nitrito salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	75
Figura 15 – RSNO e RXNO salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	76
Figura 16 – RNNO salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	77
Figura 17 – Correlação entre função endotelial e RSNO plasmático; função endotelial e nitrito plasmático	79
Figura 18 – Correlação entre PAS e RSNO plasmático; PAS e nitrito plasmático....	81
Figura 19 – Correlação entre PAM e RSNO plasmático; PAM e nitrito plasmático ..	82
Figura 20 – Correlação entre nitrito e RSNO plasmático.....	83
Figura 21 – MDA e H ₂ O ₂ plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica	85
Figura 22 – Capacidade Antioxidante Total (TAC) plasmática pré e pós 14 dias de tratamento com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica....	86

Tabelas

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2K1R - dois rins, um clipe

ABTS - 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]

ANOVA – análise de variância

BH4 - tetrahidrobiopterina

Ca²⁺ - cálcio

CAT – capacidade antioxidante total

CEP – Comitê de ética em pesquisa

DASH - Dietary Approaches to Stop Hypertension

DOCA sal - desoxicorticosterona-sal

DTPA - dimetilarginina assimétrica

EDRF – fator relaxante derivado de endotélio

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

FAD - dinucleotídeo

FMD – dilatação fluxo-mediada

Frequência cardíaca – frequência cardíaca

GMPc – Guanosina monofosfato cíclica

GSNO – S-nitrosoglutathione

GTP – Guanosina trifosfato

HCFMRP/USP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

HgCl₂ – cloreto de mercúrio

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HNO₂ - ácido nitroso

IBP – inibidor da bomba de prótons

IMC - índice de massa corporal

iNOS – sintase induzível do óxido nítrico

DTJ - dieta tradicional japonesa

ECG - eletrocardiograma

L-NAME - N-nitro-L-arginina-metil-éster

LnIHR - Índice de Hiperemia Reativa após transformação logarítmica natural

MAPA - Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial

MDA - malondialdeído

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaNO²⁻ - nitrito de sódio

NaNO³⁻ - nitrato de sódio

nNOS – sintase neuronal do óxido nítrico

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NO²⁻ - nitrito

NO³⁻ - nitrato

N₂O₃ - trióxido de nitrogênio

NO⁺ - íon nitrosônio

NEM - N-etilmaleimida

O₂ – oxigênio

PAD – pressão arterial diastólica

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PAT - Tonometria Arterial Periférica

PRÉ – pré-suplementação com nitrato de sódio

PÓS – pós-suplementação com nitrato de sódio

PKG – proteína quinase G

RNNO – espécies nitrosiladas resistentes ao mercúrio

ROS - espécies reativas de oxigênio

RSH - nitrosilação de proteínas tióis

RSNO – S-nitrosotióis

RXNO – espécies nitrosiladas

RYGB - Bypass gástrico em Y de Roux

SDS - dodecil sulfato de sódio

sGC – guanilato ciclase solúvel

-SH - tiol de cisteína

SOD - superóxido dismutase

SHR - ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

TBA - ácido tiobarbitúrico

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

Trolox - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico

UPC – Unidade de Pesquisa clínica

VOP – velocidade da onda de pulso

XOR - xantina oxidoreductase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 A formação de NO dependente da NOS e a importância desse gás na homeostase cardiovascular	23
1.2 Via nitrato-nitrito-NO como alternativa para a formação	25
1.3 Efeitos cardiovasculares do tratamento com nitrato e nitrito inorgânico em modelos animais.....	28
1.4 Efeitos da suplementação com nitrato dietético na saúde cardiovascular em humanos	30
1.5 S-nitrosotióis como mediadores dos efeitos do tratamento com nitrito e nitrato na hipertensão e a importância do ambiente ácido do estômago para esses efeitos.....	33
1.6 Obesidade e cirurgia bariátrica	35
2. HIPÓTESE	39
3. OBJETIVOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Aspectos éticos	43
4.2 Seleção dos pacientes	43
4.3 Critérios de inclusão	44
4.4 Critérios de exclusão	44
4.5 Descrição do estudo	45
4.6 Determinação das medidas funcionais	47
4.6.1 Endopat	42
4.6.2 Velocidade da onda de pulso (VOP) carótida-femoral	48
4.6.3 Medida da pressão arterial	49

4.7 Determinações bioquímicas	49
4.7.1 Determinação das concentrações de nitrato no plasma e saliva	50
4.7.2 Determinação das concentrações de nitrito no plasma e saliva	50
4.7.3 Determinação das concentrações de S-nitrosotióis (RSNO), espécies nitrosiladas (RXNO) e espécies resistentes ao mercúrio (RNNO) no plasma e saliva	51
4.8 Avaliação de marcadores circulantes de estresse oxidativo e atividade antioxidante	52
4.8.1 TBARS.....	52
4.8.2 Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	53
4.8.3 Capacidade antioxidante total (CAT)	53
4.9 Análise estatística dos resultados	54
5. RESULTADOS	56
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	105

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 A formação de NO dependente da NOS e a importância desse gás na homeostase cardiovascular

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula gasosa descoberta em 1772, considerada na época apenas um poluente ambiental nocivo (BONDONNO; CROFT; HODGSON, 2016). Apenas em 1980, a partir das descobertas de Furchgott, Ignarro e Murad foi demonstrada a importância do NO no endotélio vascular como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), o que atribuiu em 1998 o Prêmio Nobel de Fisiologia a esses três pesquisadores (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO; BUGA; WOOD; BYRNS *et al.*, 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987).

Óxido nítrico sintases (NOS) são responsáveis pela síntese de NO. Existem três isoformas da NOS, sendo elas: neuronal (nNOS ou NOS1), induzível (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3) (MONCADA, 1993). A eNOS é a isoforma predominante nos vasos sanguíneos, sendo responsável pela maior parte de NO produzido neste tecido (FORSTERMANN; LI, 2011). No endotélio, estímulos de agonistas como a acetilcolina e bradicinina, e estímulos mecânicos, como o estresse de cisalhamento, aumentam a produção de NO pela eNOS por aumentar a liberação transitória de cálcio (Ca^{2+}) dos estoques intracelulares. O Ca^{2+} se liga à calmodulina para formar o complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a eNOS (FORSTERMANN; LI, 2011).

Quando ativada, ocorre a conversão enzimática pela eNOS que requer oxigênio (O_2) e co-fatores como tetrahidrobiopterina (BH_4), nicotinamida adenina

dinucleótido fosfato (NADPH) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) resultando em L-citrulina e NO (ALKAITIS; CRABTREE, 2012).

Após sua formação nas células endoteliais, o NO, que possui tempo de meia-vida curto, difunde-se e ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) nas células do músculo liso vascular, aumentando a síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP). O GMPc atua como segundo mensageiro e ativa o seu mediador principal, a proteína quinase G (PKG), levando a múltiplas fosforilações em proteínas celulares, reduzindo assim a concentração intracelular de Ca^{2+} , o que resulta no relaxamento vascular (FRANCIS; BUSCH; CORBIN; SIBLEY, 2010; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

O NO desempenha funções críticas de sinalização no sistema cardiovascular, mas não se limitando a este, regulando o tônus vascular, o fluxo sanguíneo e da pressão arterial (MONCADA; HIGGS, 2006). Alterações na produção e/ou disponibilidade de NO acompanham ou precedem a hipertensão, aterosclerose e alterações relacionadas o angiogênese (COOKE, 2003; MATTHYS; BULT, 1997; VANHOUTTE; SHIMOKAWA; TANG; FELETOU, 2009). De fato, a inibição farmacológica da formação de NO com N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), inibidor da NOS, resulta em hipertensão e prejuízo na homeostase cardiovascular em ratos (MORENO; METZE; BENTO; ANTUNES *et al.*, 1996). Além disso, camundongos nocautes para eNOS manifestam aumento da pressão arterial e alterações metabólicas (DUPLAIN; BURCELIN; SARTORI; COOK *et al.*, 2001).

1.2 Via nitrato-nitrito-NO como alternativa para a formação de NO

O tempo de meia-vida do NO no sangue total é extremamente curto, menos de 2 ms, sendo rapidamente oxidado a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (DEMARTINO; KIM-SHAPIRO; PATEL; GLADWIN, 2019). No início da década de 1990, acreditava-se que o nitrito e nitrato eram apenas produtos finais biologicamente inativos da oxidação do NO (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008; MONCADA, 1993). No entanto, atualmente está demonstrado a bioatividade de uma via redutora que, sob condições específicas, os ânions nitrato e nitrito podem ser reciclados *in vivo* para NO, conhecida como circulação entero-salivar do nitrato ou via nitrato-nitrito-NO (Figura 1) (KAPIL; WEITZBERG; LUNDBERG; AHLUWALIA, 2014; MCKNIGHT; SMITH; DRUMMOND; DUNCAN *et al.*, 1997).

O nitrato é originado de duas fontes principais *in vivo*: do metabolismo oxidativo do NO e através da dieta, sendo as principais fontes dietéticas vegetais de folhas verdes como o espinafre, rúcula, alface e a beterraba (LUNDBERG; CARLSTROM; WEITZBERG, 2018). O nitrato da dieta é rapidamente absorvido na parte superior do intestino delgado com cerca de 100% de biodisponibilidade. Na corrente sanguínea é somado ao nitrato advindo da oxidação do NO (VAN VELZEN; SIPS; SCHOTHORST; LAMBERS *et al.*, 2008).

Grande parte do nitrato é excretado pelo rim, mas cerca de 25% é absorvido ativamente pelas glândulas salivares e secretado na saliva (SPIEGELHALDER; EISENBRAND; PREUSSMANN, 1976). Na língua, as bactérias comensais anaeróbicas facultativas reduzem o nitrato a nitrito e esse é deglutido (LUNDBERG; WEITZBERG; COLE; BENJAMIN, 2004). O nitrito presente na saliva, em contato com o pH ácido do estômago, é protonado imediatamente em ácido nitroso (HNO_2),

que decompõe-se em NO e em espécies nitrosantes como trióxido de nitrogênio (N_2O_3) e o íon nitrosônio (NO^+), conforme demonstrado nas seguintes equações (eq. 1–4) (BENJAMIN; O'DRISCOLL; DOUGALL; DUNCAN *et al.*, 1994; LUNDBERG; WEITZBERG; LUNDBERG; ALVING, 1994):

- (1) $\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HNO}_2$
- (2) $\text{HNO}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NO}_2^+ \rightleftharpoons \text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}$
- (3) $\text{H}_2\text{NO}_2^+ + \text{NO}_2^- \rightleftharpoons \text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}$
- (4) $\text{ON}^+ - \text{NO}_2^- \rightleftharpoons \text{NO} + \text{NO}_2$

Nessa etapa da via ocorre a formação não enzimática de NO. Também ocorre, dependente de NO^+ , a formação de espécies relacionadas ao NO, como os compostos S-nitroso, N-nitroso e O-nitroso que podem promover a nitrosilação de proteínas tióis (RSH), resultando na formação de S-nitrosotiol (RSNO), espécies nitrosiladas resistentes ao mercúrio (RNNO) como a N-nitrosamina, e O-nitroso (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019; WEITZBERG; LUNDBERG, 2013). O ambiente ácido do estômago tem papel fundamental para essas reações (LUNDBERG; WEITZBERG; LUNDBERG; ALVING, 1994).

O nitrito remanescente entra na circulação sistêmica após absorção e no sangue e tecidos pode ser reduzido a NO por muitas proteínas e enzimas com ação nitrito-redutases como hemoglobina, mioglobina, xantina oxidoreductase (XOR) e complexos na cadeia respiratória mitocondrial (SCHIFFER; LUNDBERG; WEITZBERG; CARLSTROM, 2020).

A via nitrato-nitrito-NO é então uma fonte alternativa de formação de NO, não dependente da NOS pela via clássica. A produção de NO mediada por essa via é intensificada em condição ácida e de hipóxia (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Figura 1 - Via Nitrato-nitrito-NO. O nitrato inorgânico ingerido é absorvido no intestino delgado e é extraído ativamente pelas glândulas salivares e concentrado na saliva. Na boca o nitrato é reduzido a nitrito pela ação de bactérias comensais presentes na cavidade oral. No ambiente gástrico, marcado pela sua acidez, há a redução do nitrito a óxido nítrico e espécies relacionadas ao NO. Na circulação o nitrito pode ser convertido a NO por enzimas com ação nitrito-redutase. Adaptado de Lundberg et al 2008.

Em conjunto, as evidências científicas a partir de estudos experimentais e clínicos descreveram efeitos cardiovasculares e metabólicos do nitrato dietético, dentre eles a redução da pressão arterial, melhora da função endotelial, melhora do estado redox, aumento do desempenho nos exercícios e efeitos antidiabéticos (LUNDBERG; CARLSTROM; WEITZBERG, 2018). O nitrito formado pela via nitrato-nitrito-NO pode exercer seus efeitos via formação direta de NO ou por S-nitrosilação de resíduos de cisteína (LUNDBERG; CARLSTROM; WEITZBERG, 2018).

1.3 Efeitos cardiovasculares do tratamento com nitrato e nitrito de inorgânico em modelos animais

A maioria dos distúrbios cardiovasculares, particularmente a hipertensão arterial, são associados ao estresse oxidativo e a disfunção endotelial (INCALZA; D'ORIA; NATALICCHIO; PERRINI *et al.*, 2018). O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o sistema de defesa antioxidante (PAOLOCCI; BIONDI; BETTINI; LEE *et al.*, 2001). Nos vasos sanguíneos, ao reduzir a biodisponibilidade de NO, o estresse oxidativo representa uma causa primária de disfunção endotelial (INCALZA; D'ORIA; NATALICCHIO; PERRINI *et al.*, 2018).

Após diversas pesquisas na última década, têm sido extensivamente demonstrados os efeitos benéficos do nitrito e nitrato inorgânico em doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão. Classen et al, em 1999 demonstraram pela primeira vez os efeitos anti-hipertensivos do nitrito. Uma dose aguda de nitrito diminuiu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (HAAS; CLASSEN; THONI; CLASSEN *et al.*, 1999). Após o tratamento crônico ou agudo

com nitrato ou nitrito, também foram demonstrados efeitos semelhantes em outros modelos de hipertensão como dois rins, um clipe (2K1C), L-NAME e o modelo desoxicorticosterona-sal (DOCA sal), resultando em até 40 mm Hg de redução da pressão arterial (CARLSTROM; PERSSON; LARSSON; HEZEL *et al.*, 2011; MONTENEGRO; AMARAL; PINHEIRO; SAKAMOTO *et al.*, 2011; PINHEIRO; AMARAL; FERREIRA; PORTELLA *et al.*, 2015; SANCHES-LOPES; FERREIRA; PINHEIRO; KEMP *et al.*, 2020).

Diversos estudos em roedores demonstraram que o tratamento com nitrato e nitrito está associado à redução do estresse oxidativo pela inibição da atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase vascular (AMARAL; FERREIRA; PINHEIRO; MONTENEGRO *et al.*, 2015; CARLSTROM; PERSSON; LARSSON; HEZEL *et al.*, 2011; GAO; YANG; LIU; PELELI *et al.*, 2015; MONTENEGRO; AMARAL; PINHEIRO; SAKAMOTO *et al.*, 2011). O tratamento com nitrito também exerce efeitos antioxidantes, como demonstrado em modelo de hipertensão 2R1C restaurando a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), em ratos wistar (MONTENEGRO; PINHEIRO; AMARAL; MARCAL *et al.*, 2012)

O tratamento crônico com nitrito de sódio melhora da disfunção endotelial, em vasos de condutância e resistência, na hipertensão 2R1C, SHR e infusão de angiotensina II, em paralelo com a melhora do estresse oxidativo, o que contribui para o seu efeito anti-hipertensivo (AMARAL; RIZZI; ALVES-LOPES; PINHEIRO *et al.*, 2019; LING; MURUGAN; LAU; VANHOUTTE *et al.*, 2016; LING; MUSTAFA; VANHOUTTE; MURUGAN, 2018).

1.4 Efeitos da suplementação com nitrato dietético na saúde cardiovascular em humanos

Dietas vegetarianas como a *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), dietas mediterrâneas e japonesas reduzem a pressão e promovem proteção ao sistema cardiovascular (KHATRI; MILLS; MASKELL; ODONGEREL *et al.*, 2017). Embora os mecanismos possam ser multifatoriais, elas contêm grandes quantidades de nitrato inorgânico cerca de 1222 mg por dia, em relação a uma dieta ocidental cerca de 75 mg por dia (HORD; TANG; BRYAN, 2009).

A redução da pressão arterial é um dos efeitos mais estudados e reprodutíveis do nitrato inorgânico dietético, normalmente utilizando suplementação com suco/extrato de beterraba, em humanos. Esse efeito é encontrado em indivíduos normotensos e hipertensos (JACKSON; PATTERSON; MACDONALD-WICKS; MCEVOY, 2017).

Em 2003, o primeiro estudo clínico conduzido por Cosby *et al.* demonstraram que a infusão aguda de nitrito de sódio (NaNO_2^-) reduziu a pressão arterial média em 7 mmHg em indivíduos normotensos (COSBY; PARTOVI; CRAWFORD; PATEL *et al.*, 2003). Já em 2006 Larsen *et al.*, relatou a primeira evidencia clínica dos efeitos do nitrato inorgânico na pressão arterial. Nesse estudo, voluntários saudáveis receberam uma suplementação dietética por 3 dias de nitrato de sódio (NaNO_3^-) (0,1 mmol/kg/dia). O estudo foi randomizado, duplo-cego, cruzado e observaram redução de 3,7 mmHg na pressão diastólica e 3,2 mmHg na pressão arterial média comparado ao placebo (LARSEN; EKBLOM; SAHLIN; LUNDBERG *et al.*, 2006). Esse grupo, nas mesmas condições do estudo anterior, demonstrou redução da

pressão arterial sistólica (112 ± 8 mmHg) em comparação com o placebo ($120 \pm 5,9$) (LARSEN; WEITZBERG; LUNDBERG; EKBLOM, 2007)

Seguido desses estudos, Webb et al. avaliaram em voluntários normotensos a suplementação dietética com nitrato de sódio utilizando uma dose única de suco de beterraba (500 mL). Essa intervenção resultou em redução da pressão arterial sistólica, diastólica e média, sendo a queda de 10 mmHg, 8 mmHg e 8 mmHg respectivamente. Nesse estudo também foi analisada a dilatação fluxo-mediada (FMD) da artéria braquial que avalia a função endotelial. A suplementação com suco de beterraba melhora a função endotelial, em voluntários saudáveis (WEBB; PATEL; LOUKOGEORGAKIS; OKORIE *et al.*, 2008).

Um estudo cruzado e randomizado avaliou o efeito da dieta tradicional japonesa (JTD) na pressão arterial, durante 10 dias em voluntários normotensos. O nitrato fornecido pela JTD foi de 18,8 mg/kg/dia e resultou em uma diminuição média de 4,5 mmHg na pressão arterial diastólica comparado a dieta controle (SOBKO; MARCUS; GOVONI; KAMIYA, 2010).

Quando avaliados nesses trabalhos, a suplementação com nitrato de sódio aumentou os níveis de nitrato e nitrito plasmático em paralelo com a melhora na pressão arterial e função endotelial (LARSEN; WEITZBERG; LUNDBERG; EKBLOM, 2007; SOBKO; MARCUS; GOVONI; KAMIYA, 2010; WEBB; PATEL; LOUKOGEORGAKIS; OKORIE *et al.*, 2008).

Um estudo de coorte prospectivo acompanhou por 3 anos voluntários normotensos e descobriram que a maior ingestão dietética de vegetais contendo nitrato pode ter um efeito protetor contra o desenvolvimento de hipertensão arterial (GOLZARAND; BAHADORAN; MIRMIRAN; ZADEH-VAKILI *et al.*, 2016).

Diversos estudos também demonstraram os efeitos anti-hipertensivos e na função cardiovascular após a suplementação dietética com nitrato de sódio. Dentre eles, em um ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, voluntários hipertensos receberam suplementação diária por 4 semanas com 6,4 mmol nitrato de sódio (250 de suco de beterraba), sendo observado a redução sustentada da pressão arterial sistólica e diastólica após o tratamento, melhora da função endotelial avaliado pelo FMD e diminuição da rigidez vascular avaliada pela velocidade da onda de pulso (VOP) (KAPIL; KHAMBATA; ROBERTSON; CAULFIELD *et al.*, 2015).

Dados robustos de uma meta-análise revelaram que a suplementação com nitrato inorgânico e suco de beterraba foi associada a uma redução significativa da pressão arterial (SIERVO; LARA; OGBONMWAN; MATHERS, 2013). É evidente que o nitrato inorgânico reduz a pressão arterial, entretanto esses achados não são consistentes em todas as literaturas, assim como a melhora da função endotelial e a rigidez vascular (BAILEY; FULFORD; VANHATALO; WINYARD *et al.*, 2010; GILCHRIST; WINYARD; AIZAWA; ANNING *et al.*, 2013; HOBBS; KAFFA; GEORGE; METHVEN *et al.*, 2012; JONES; DUNN; MACDONALD; KUBIS *et al.*, 2019; MENEZES; PEIXOTO; TEIXEIRA; JUSTINO *et al.*, 2019). Assim, são necessárias mais investigação, a fim de melhor compreender esses efeitos na população em geral.

1.5 S-nitrosotióis como mediadores dos efeitos do tratamento com nitrito e nitrato na hipertensão e a importância do ambiente ácido do estômago para esses efeitos

Os mecanismos que resultam no efeito anti-hipertensivo e na melhora da função cardiovascular, após o tratamento com nitrato e nitrito inorgânico, não estão totalmente elucidados. Um dos mecanismos é a redução dessas moléculas a NO tendo efeitos mediados pela ativação da via NO-GPMc (KAPIL; MILSOM; OKORIE; MALEKI-TOYSERKANI *et al.*, 2010). Outro possível mecanismo é a formação gástrica de espécies relacionadas ao NO, como os S-nitrosotióis e esses podem S-nitrosilar proteínas e alterar suas funções (OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2019). O NO e os S-nitrosotióis são formados pela via nitrato-nitrito-NO, principalmente, quando o nitrito entra em contato com o suco gástrico (item 1.5).

A S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional na qual um tiol de cisteína (-SH) é ligado de forma covalente a um grupo derivado do NO, com a consequente formação de S-nitrosotióis (SNO) (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019). S-nitrosilação ocorre em proteínas, produzindo S-nitroso-proteínas (proteínas SNO) e também em tióis de baixo peso molecular dentre os quais se destaca a S-nitrosoglutationa (GSNO) que é apta a liberar o NO para o meio ou, ainda S-nitrosilar proteínas por transnitrosilação, que é a transferência do grupamento nitroso (SNO) do tiol do GSNO para o resíduo de cisteína de uma proteína (HOGG, 2000; STAMLER; LAMAS; FANG, 2001).

Evidências das últimas três décadas apontam a importância da S-nitrosilação na regulação de diversas vias de sinalização (ANAND; STAMLER, 2012) (AEBI, 1984) que, embora ainda pouco explorada, pode alterar a função de proteínas

(HESS; MATSUMOTO; KIM; MARSHALL *et al.*, 2005; STAMLER, 1994). O tratamento com nitrato e nitrito, por gerar nitrosotióis, pode exercer suas ações biológicas através da S-nitrosilação de proteínas alvos na hipertensão arterial e funções cardiovasculares (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009; NETO-NEVES; PINHEIRO; NOGUEIRA; PORTELLA *et al.*, 2019).

De fato, o nitrito de sódio oral reduz a pressão arterial de forma proporcional às concentrações de S-nitrosotióis no plasma (PINHEIRO; AMARAL; FERREIRA; PORTELLA *et al.*, 2015; PINHEIRO; FERREIRA; AMARAL; PORTELLA *et al.*, 2016). Apoiando esses achados, a infusão de GSNO, importante agente S-nitrosilante, por via intravenosa, aumentou a formação de S-nitrosotióis e os efeitos anti-hipertensivos do nitrito administrado oral. Ainda nesse estudo, a inibição farmacológica do GSNO prejudicou o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio enquanto reduziu a concentração plasmática de S-nitrosotiol, ambos efeitos independentes do nitrito plasmático (PINHEIRO; AMARAL; FERREIRA; PORTELLA *et al.*, 2015).

Neste sentido, alterações no ambiente ácido do estômago afetam o efeito anti-hipertensivo. Estudos do nosso grupo mostraram que o omeprazol, inibidor da bomba de prótons (IBP), e a ranitidina, antagonista de receptor H₂, por aumentarem o pH gástrico, reduzem significativamente os efeitos hipotensores de nitrito de sódio por reduzir a formação gástrica de NO e S-nitrosotióis, em ratos hipertensos (PINHEIRO; MONTENEGRO; AMARAL; FERREIRA *et al.*, 2012; SANCHES-LOPES; FERREIRA; PINHEIRO; KEMP *et al.*, 2020).

As implicações clínicas desses achados foram avaliadas em um estudo clínico com voluntários saudáveis que foram pré-tratados com placebo ou esomeprazol e 1 hora depois receberam uma dose de nitrito de sódio. A redução da

pressão arterial provocada pelo nitrito de sódio é abolida em pacientes que fazem uso de esomeprazol, um IBP, (MONTENEGRO; SUNDQVIST; LARSEN; ZHUGE *et al.*, 2017) o que reforça a importância do ambiente ácido no efeito de redução da pressão arterial pelo tratamento com nitrito.

Entretanto até o presente, não se sabe se outras intervenções no trato gastrointestinal como, por exemplo, a cirurgia bariátrica indicada para indivíduos obesos, poderia afetar a via nitrato-nitrito-NO e comprometer os efeitos no sistema cardiovascular.

1.6 Obesidade e cirurgia bariátrica

A obesidade é um problema de saúde pública. A cirurgia bariátrica é eficaz por promover uma perda sustentada de peso e melhorar comorbidades relacionados como diabetes mellitus tipo II, hipertensão e dislipidemias (ALBAUGH; BANAN; AJOUZ; ABUMRAD *et al.*, 2017; YU, 2014).

O Bypass gástrico em Y de Roux (RYGB) é o procedimento bariátrico mais comumente realizado (KAPOOR; AL-NAJIM; LE ROUX; DOCHERTY, 2017). Durante a cirurgia o estômago é dividido em duas porções. A menor porção apresenta um volume de 20 a 50 ml e é ela que recebe o alimento e/ou líquido. Esse reservatório gástrico é anastomosado a uma alça jejunal isolada em Y. O estômago remanescente, assim como o duodeno e os primeiros 50 cm de jejuno, ficam permanentemente excluídos do trânsito alimentar. As secreções provenientes do estômago e do duodeno remanescente chegam ao jejuno por uma anastomose (Figura 2) (BULT; VAN DALEN; MULLER, 2008; WESTLING; GUSTAVSSON, 2001).

Figura 2 - Modelo cirúrgico Bypass gástrico em Y de Roux. No modelo cirúrgico Bypass gástrico em Y de Roux o estômago é dividido em duas porções e uma anastomose é feita entre a menor porção e jejuno do indivíduo, em Y. Também é realizada uma anastomose entre duodeno e jejuno a fim de que as secreções gástricas e duodenais essenciais à digestão participem deste processo. Adaptado de (LE ROUX; HENEGHAN, 2018)

Em pacientes que realizaram a cirurgia gástrica em Y de Roux, o segmento inicial do estômago produz expressivamente menos ácido que o estômago completo produz (COLLARES-PELIZARO; SANTOS; NONINO; GAITANI *et al.*, 2017; MILLER; SMITH, 2006). A cirurgia gástrica em Y de Roux aumenta o pH gástrico de 1,8 para 5,7 logo após um dia da realização da cirurgia (PORAT; VAYNSHTEIN; GIBORI; AVRAMOFF *et al.*, 2021). O aumento do pH e a redução do volume do gástrico podem comprometer a dissolução de fármacos dependente do pH e reduzir a sua biodisponibilidade (DRESSMAN; VERTZONI; GOUMAS; REPPAS, 2007; PORAT; DAHAN, 2020).

A via nitrato-nitrito-NO é extremamente dependente do ambiente ácido do estômago para formar NO e espécies relacionadas ao NO que são tidos como mediadores dos efeitos da suplementação dessa via, porém a interferência da cirurgia gástrica em Y de Roux na via nitrato-nitrito-NO ainda não foi analisada até o desenvolvimento do presente estudo.

HIPÓTESE

2. Hipótese

Pacientes que foram submetidos à cirurgia bariátrica, por apresentarem redução da área do estômago e aumento do pH gástrico, apresentam menor queda na PA, menores aumentos das concentrações plasmáticas de S-nitrosotióis, menor efeito antioxidante após a suplementação alimentar com nitrato, contido no extrato de beterraba, quando comparados a pacientes que não foram submetidos a cirurgia bariátrica.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar e comparar os efeitos da suplementação com nitrato de sódio, contido no extrato de beterraba, em pacientes que passaram pela cirurgia bariátrica ou não.

3.2 Objetivos específicos

Comparar pacientes que passaram pela cirurgia bariátrica ou não quanto aos efeitos da ingestão de extrato de beterraba sobre:

- Pressão arterial
- Função endotelial pelo endopat;
- Rigidez vascular pela velocidade da onda de pulso (VOP);
- Concentrações de nitrato, nitrito, RXNO, RSNO e RNNO no plasma;
- Concentrações de nitrato, nitrito, RXNO, RSNO e RNNO na saliva;
- Marcadores circulantes de estresse oxidativo: TBARS e H₂O₂;
- Capacidade antioxidante total (CAT).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP – HCFMRP/USP, CAAE: 88796918.2.0000.5440. A coleta de dados foi realizada em indivíduos que uma vez convidados, concordaram em participar do estudo, sendo incluídos somente aqueles se encaixaram nos critérios de inclusão e exclusão e que leram, compreenderam e autorizaram sua participação, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente aprovado pelo CEP.

4.2 Seleção dos pacientes

O estudo foi realizado com pacientes do sexo feminino que foram submetidas à cirurgia bariátrica de Y em Roux há no mínimo 1 ano e meio, de acordo com o protocolo do Departamento de Cirurgia e Anatomia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP / USP) com base e critérios internacionalmente reconhecidos. Os indivíduos controles são voluntárias do sexo feminino que não realizaram a cirurgia bariátrica.

A estimativa do tamanho amostral deste estudo baseou-se em um estudo prévio que avaliou o efeito do tratamento com nitrito de sódio nas concentrações de S-nitrosotióis no plasma de pacientes (BJORNE; GOVONI; TORNBERG; LUNDBERG *et al.*, 2005). Foi utilizado um poder estatístico de 80% e alfa de 5% e

as concentrações plasmáticas médias de nitrosotíóis antes (15 ± 11 nM) e após a administração de nitrito de sódio (26 ± 18 nM), observadas neste estudo prévio (BJORNE; GOVONI; TORNBERG; LUNDBERG *et al.*, 2005). O cálculo foi realizado por meio do software G*Power 3.1.9.2 e revelou um $n = 15$ voluntários por grupo. A estimativa do tamanho amostral deste estudo é de 15 voluntários que realizaram a cirurgia bariátrica e 15 voluntários que não realizaram a cirurgia.

4.3 Critérios de Inclusão

- Para voluntárias que realizaram a cirurgia bariátrica:

1. Sexo feminino;
2. Idade acima de 18 anos e abaixo de 60 anos;
3. Ter realizado a cirurgia bariátrica há mais de 1 ano e meio;
4. Apresentar perda de peso estabilizada;

- Para voluntárias controles:

1. Sexo feminino;
2. Idade acima de 18 anos e abaixo de 60 anos;

4.4 Critérios de Exclusão

- Para voluntários que realizaram a cirurgia bariátrica e controles:

1. Ter pressão arterial não controlada (acima de 160/100 mmHg), mesmo com o uso regular até dois agentes anti-hipertensivos;
2. Pacientes hipertensos devem estar usando no máximo dois anti-hipertensivos;

3. Possuir Diabetes Mellitus ou outra endocrinopatia;
4. Ter insuficiência renal ou hepática;
5. Indivíduos fumantes.

4.5 Descrição do estudo

Os dois grupos de voluntárias são: as submetidas à cirurgia bariátrica de Y em Roux e as que não passaram pela cirurgia. As voluntárias que concordaram em participar e que assinaram o TCLE foram submetidas a uma avaliação inicial (V0) para confirmação dos critérios de elegibilidade para o estudo. As participantes foram informadas para evitar consumir vegetais ou alimentos ricos em nitrato e não utilizar enxaguante bucal e omeprazol durante o período do experimento.

As voluntárias que apresentaram todos os critérios de elegibilidade agendaram a primeira visita (V1) e foram instruídas a realizar jejum de 8 horas antes do procedimento. Na V1, essas voluntárias em jejum foram internadas às 7h na Unidade de Pesquisa Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (UPC) e, antes de iniciarem o tratamento com o extrato de beterraba, tiveram a velocidade da onda de pulso (VOP) analisada através do aparelho SphygmoCor, e a função endotelial analisada utilizando o aparelho Endopat. Também foram avaliadas as medidas antropométricas: idade, peso, índice de massa corporal (IMC), altura e coletado sangue para avaliação do colesterol, triglicérides, HDL, LDL, ácido úrico, glicemia e creatinina.

Após essas análises foi realizada uma coleta basal de sangue e saliva para as quantificações bioquímicas do protocolo de estudo. Foi coletado 30 mL de sangue e 5mL de saliva. Por fim, um monitor de pressão arterial ambulatorial

(MAPA) de 24h foi instalado e as voluntárias orientadas a retornar no dia seguinte para a retirada do aparelho.

No dia seguinte a V1 (V2), as voluntárias retornaram para retirada do MAPA e receberam via oral o extrato de beterraba que foi diluído em 200 ml de água para se obter uma dose diária de 0,1 mmol/kg de nitrato (LARSEN; EKBLOM; SAHLIN; LUNDBERG *et al.*, 2006). As voluntárias ficaram em observação por 30 minutos após a ingestão do extrato de beterraba. Foram instruídas a ingerir o composto no período da manhã, do mesmo modo que foi realizado durante a primeira administração, durante o período de 14 dias.

No 14º dia (V3), o último dia de tratamento, as voluntárias foram instruídas a realizar jejum de 8 horas antes do procedimento. Retornam a UPC às 7h e tiveram a velocidade de onda de pulso (VOP) analisada novamente, bem como a função endotelial, pelo Endopat. Em seguida, o monitor de pressão arterial ambulatorial (MAPA) de 24 horas foi instalado nas participantes do estudo e foi realizada a primeira medida da pressão arterial.

Depois de realizadas as medidas funcionais e a colocação do MAPA, as voluntárias tomaram a última dose do extrato de beterraba contendo nitrato de sódio. Após 2 horas e 30 minutos da ingestão, foi realizada uma coleta de sangue e saliva para as quantificações bioquímicas do protocolo de estudo. Foram coletados 30 mL de sangue e 5 mL de saliva.

No dia seguinte (V4), as voluntárias retornam a UPC para a retirada do aparelho e a parte de coleta do estudo era encerrada com a retirada do MAPA 24 horas.

A duração total prevista entre o V1 e V4 foi de 16 dias.

As voluntárias receberam uma dose diária de 0,1 mmol/kg de nitrato, ou seja, 6,2 mg de nitrato por quilo. A dose diária de extrato de beterraba foi corrigida pelo peso das voluntárias e foi fornecido aos participantes do estudo saches contendo a quantidade diária do extrato.

A coleta de sangue (30 mL) foi feita mediante as normas estabelecidas pelo ministério da saúde. Foram utilizados tubos de coleta adequados de acordo com os procedimentos bioquímicos. As alíquotas foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 4000 RPM para a obtenção de plasma. Alíquotas de foram adicionadas a uma solução contendo N-etilmaleimida (NEM) (10 mmol / L) e dietilenotriaminopenta ácido (DTPA) (2mmol / L) para preservar S-nitrosotióis.

A salivação não é estimulada e as amostras a foram coletadas em tubos protegidos da luz.

Após a coleta, as amostras foram processadas e armazenadas em freezer -70° C.

4.6 Determinação das medidas funcionais

4.6.1 Endopat

O EndoPat é uma técnica não-invasiva para avaliar a função endotelial utilizando a tecnologia da Tonometria Arterial Periférica (PAT). O dispositivo utilizado

EndoPat 2000 device (Itamar Medical, Caesarea, Israel) é equipado com um manguito de pressão sanguínea padrão e sensores pneumáticos que medem mudanças no tônus arterial, mediadas pelo endotélio vascular. Examinadores treinados realizaram os exames.

Para o teste, as voluntárias estavam em um ambiente calmo e foram orientadas a deitar-se com braços e pernas estendidos. Os sensores pneumáticos foram colocados nos dedos indicadores para avaliação da amplitude de pulso durante toda a avaliação. Os braços ficaram em posição supina e após as medidas basais, o braço não dominante foi ocluído usando um manguito de aparelho de pressão por 5 minutos. Após esse período foi medida a amplitude após a oclusão com a finalidade de avaliar as respostas a hiperemia reativa. O controle do estudo foi o braço contrário não ocluído.

Os valores foram obtidos em Índice de Hiperemia Reativa após transformação logarítmica natural (LnIHR) que representa os valores pré e pós-oclusão no lado ocluído normalizado pelo lado controle e corrigido pelo tônus vascular basal. O LnIHR normal é igual ou superior a 0,51. Valores menores são indicativos de disfunção endotelial (AXTELL; GOMARI; COOKE, 2010)

4.6.2 Velocidade de onda de pulso (VOP) carótida- femoral

A técnica de velocidade de onda pulso é o “padrão ouro” para a avaliação da rigidez arterial. A VOP carótida-femoral foi mensurada por um observador experiente e a avaliação foi iniciada após 15 minutos de repouso em posição supina.

Para a análise da VOP foi medida a distância entre a carótida e a femoral e realizada a tonometria de aplanção nos pulsos carotídeos e femorais direito, concomitantes ao eletrocardiograma (ECG).

A avaliação da VOP, a partir do tempo de trânsito carotídeo-femoral e a distância percorrida, foi realizada pelo sistema automático computadorizado SphygmoCor CPV System (AtCor Medical, Austrália) (JAIN; GURUBHAGAVATULA; TOWNSEND; KUNA *et al.*, 2017).

4.6.3 Medida da Pressão Arterial

A pressão arterial de 24h (sistólica, diastólica e média) foi aferida por meio do aparelho automático de Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA, DYNAMAPA, Cardios, São Paulo, Brasil) que foi instalado, na UPC, com programação para medidas da PA durante a vigília (07:00 as 23:00h) de 15 em 15 minutos e durante o sono (23:00 as 07:00h) de 30 em 30 minutos, sendo retirado na UPC no dia seguinte a visita no qual foi instalado.

4.7 Determinações bioquímicas

4.7.1 Determinação das concentrações de nitrato no plasma e na saliva

As concentrações de nitrato em amostras de plasma e saliva dos 2 grupos experimentais foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (LUNDBERG; GOVONI, 2004).

Foram injetadas, no purge vessel em sistema fechado contendo solução ácida de cloreto de vanádio (63 mM) a 95°C, 20 µl de amostra de plasma em duplicatas para a análise de nitrato no plasma ou 20 µl de amostra de saliva em duplicatas (diluída 1:100 em água ultrapura) para a análise de nitrato na saliva. O nitrato presente na amostra é reduzido a NO que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers 280i). O NO formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência com intensidade proporcional a formação de NO. Os dados obtidos foram analisados pelo programa OriginPro 8.5.

4.7.2 Determinação das concentrações de nitrito no plasma e na saliva

As concentrações de nitrito em amostras de plasma e saliva dos 2 grupos experimentais foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (PELLETIER; KLEINBONGARD; RINGWOOD; HITO *et al.*, 2006).

Foram injetados 100 µl de amostra do plasma ou 20 µl de amostras de saliva no purge vessel em sistema fechado contendo solução redutora de triiodeto (67mM iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial).

O nitrito da amostra é reduzido a NO que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). O NO formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO. A aquisição dos dados e as análises foram realizadas através do software eDAQ Chart.

4.7.3 Determinação das concentrações de S-nitrosotióis (RSNO), espécies nitrosiladas (RXNO) e espécies resistentes ao mercúrio (RNNO) no plasma e na saliva

As concentrações de RSNO, RXNO e RNNO em amostras de plasma e saliva dos 2 grupos experimentais foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (YANG; VIVAS; REITER; GLADWIN, 2003).

Amostras de plasma (450 µl) ou saliva (200 µl) foram aliquotadas em 2 micro tubos âmbar. Em um tubo foi adicionada à amostra a solução de sulfanilamida (5% em HCl 1M) na proporção de 10% do volume final da solução. Após 3 minutos de reação, as amostras foram injetadas no purge vessel em um sistema fechado contendo solução redutora de triiodeto (67 mM Iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial). A sulfanilamida quela o nitrito presente na solução, de forma que a única fonte de NO disponível na solução seja oriundo das espécies nitrosiladas (RXNO).

Em outro tubo âmbar foi adicionado na amostra solução de cloreto de mercúrio 2% (HgCl₂) por 2 min, seguido da adição de sulfanilamida ácida (5% em HCl 1M) por 3 min. As duas soluções foram adicionadas na proporção de 10% do volume final da solução. Após o tempo de reação especificado, as amostras foram injetadas no purge vessel como descrito anteriormente. O mercúrio destrói as espécies nitrosiladas não resistentes a mercúrio (RXNO), na sequência a sulfanilamida quela o nitrito presente na solução, desta forma a única fonte de NO na solução é das espécies nitrosiladas resistentes à mercúrio (RNNO).

As espécies nitrosiladas da amostra são reduzidas a NO que é carreado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). O NO formado reage

com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO.

A quantificação de S-nitrosotióis (RSNO) presentes na amostra foi feita através do cálculo da diferença entre o sinal detectado pelo conteúdo de espécies nitrosiladas totais (RXNO) (amostra na presença de sulfanilamida ácida) e espécies nitrosiladas resistentes à mercúrio (RNNO) (amostras na presença de sulfanilamida e mercúrio).

A aquisição dos dados e as análises foram realizadas através do software eDAQ Chart.

4.8 Avaliação de marcadores circulantes de estresse oxidativo e atividade antioxidante

Para examinar se o tratamento com nitrato de sódio afetou os níveis circulantes de marcadores de estresse oxidativo, nos 2 grupos experimentais foi avaliado a concentração de H₂O₂ e a peroxidação lipídica através do método TBARS. Também foi avaliada a capacidade antioxidante total (CAT). Todas as análises foram feitas no plasma.

4.8.1 T-BARS

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliadas conforme descrito por Ohkawa et al. (1979) com modificações. Este método baseia-se que alguns dos produtos de peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA), desta forma adicionando TBA ao plasma é possível detectar a

presença dessas substâncias conhecidas como TBARS, sendo o malondialdeído (MDA) a principal delas.

Amostras de plasma em duplicata foram incubadas com tampão ácido acético (pH 3,5), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e TBA 0,6% a 95°C durante 1 hora. Após, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4000rpm. O sobrenadante foi utilizado para a leitura espectrofotométrica em 532nm, utilizando se MDA como padrão (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.8.2 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para o ensaio de H₂O₂ foi utilizado o kit de reagentes Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen, A22188) de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, na presença de peroxidase é detectada a reação do H₂O₂ com o Amplex Red, que produz resorufina, produto de oxidação vermelho-fluorescente. A fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de excitação: 530 nm e emissão: 590 nm. Curva-padrão para H₂O₂ foi feita com o padrão do fabricante e utilizada para determinar as concentrações de H₂O₂ das amostras de plasma analisadas. As análises foram realizadas em duplicata.

4.8.3 Capacidade antioxidante total (CAT)

Para avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) foi utilizado Antioxidant assay kit (Cayman Chemical C, 709001) de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio é baseado na capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras inibirem a oxidação de ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) para

ABTS^{•+} pela metamioglobina. A concentração de ABTS^{•+} foi mensurada pela leitura da placa após 30 minutos da reação, em uma faixa de absorbância de 750 nm. A diminuição na absorbância foi proporcional à concentração de antioxidantes nas amostras de plasma analisadas.

A CAT da amostra para evitar a oxidação de ABTS é comparada com a curva-padrão de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), antioxidante análogo de tocoferol solúvel em água e é quantificada como mM de equivalentes de Trolox.

4.9 Análises estatísticas dos resultados

Os dados foram inicialmente submetidos à avaliação da distribuição normal de cada variável. Os dados obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média e analisados por ANOVA de duas vias para medidas repetidas. O nível de significância estatístico utilizado foi de 95% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9.

RESULTADOS

5. Resultados

Foram coletados dados sobre as características clínicas e laboratoriais dos pacientes dos grupos controle e cirurgia bariátrica, conforme apresentado na Tabela 1. Os indivíduos do grupo cirurgia bariátrica apresentaram um perfil semelhante aos indivíduos do grupo controle e não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) quanto à idade, peso, índice de massa corporal (IMC), altura, colesterol, triglicérides, HDL, LDL, ácido úrico, glicemia e creatinina.

Tabela 1 – Características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes.

Características Individuais dos Grupos			
Parâmetros	Controle	Cirurgia Bariátrica	Valor de p
Idade	41.8 ± 2.5	47.3 ± 2.9	0.1733
Peso	75.47 ± 4.10	78.60 ± 3.21	0.5524
Altura	1.62 ± 0.01	1.59 ± 0.02	0.1523
IMC	28.1 ± 1.5	31.0 ± 1.0	0.1400
Colesterol	189.1 ± 6.4	183.5 ± 7.3	0.5893
Triglicérides	85.6 ± 8.0	89.4 ± 9.0	0.7692
HDL	54.9 ± 2.5	59.2 ± 3.5	0.3737
LDL	118.8 ± 7.3	106.5 ± 6.0	0.2077
Ácido úrico	3.4 ± 0.2	4.0 ± 0.2	0.1135
Glicemia	84.4 ± 1.4	85.4 ± 2.2	0.7366
Creatinina	0.72 ± 0.04	0.67 ± 0.02	0.2956

Tabela 1 – Características individuais dos grupos controle e da cirurgia bariátrica quanto à idade, peso, altura, IMC, colesterol, triglicérides, HDL, LDL, ácido úrico, glicemia e creatinina. (n= 10 – 15 por grupo). Os dados são apresentados como média ± EPM.

A fim de avaliar se a suplementação dietética com nitrato de sódio altera a pressão arterial e a frequência cardíaca de mulheres controle e que passaram pela cirurgia bariátrica, foi realizado o MAPA de 24 horas. Para as análises, os parâmetros analisados foram divididos entre período de vigília e sono dos voluntários.

Foi observado, no grupo controle, redução de cerca de 6 mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) no período vigília após a suplementação com nitrato de sódio (PRÉ = $132,4 \pm 2,7$ mmHg ; PÓS = $126,8 \pm 3,1$ mmHg; $p < 0,05$). Enquanto a PAS no período sono não foi alterada (PRÉ = $114,2 \pm 4,4$ mmHg; PÓS = $114,2 \pm 4,5$ mmHg; $p > 0,05$), como apresentado na Figura 3 (A e B).

Já nos voluntários do grupo cirurgia bariátrica, não houveram alterações significativas nas PAS vigília (PRÉ = $134,6 \pm 2,2$ mmHg; PÓS = $133,9 \pm 2,4$ mmHg; $p > 0,05$) e sono (PRÉ = $119,1 \pm 4,1$ mmHg; PÓS = $118,7 \pm 3,6$ mmHg; $p > 0,05$) após a suplementação (Figura 3 A e B).

Houve interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia na PAS vigília, de forma que observamos maiores quedas de PAS após tratamento no grupo controle ($F_{1,26} = 5,307$; $p < 0,05$; Figura 3A).

Figura 3 – Pressão arterial sistólica nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) Pressão arterial sistólica no período de vigília. Interação: $F_{1,26} = 5,307$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1,26} = 8,930$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,26} = 1,679$; $p > 0,05$. **B)** Pressão arterial sistólica no período de sono. Interação: $F_{1,23} = 0,012$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,23} = 0,846$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,23} = 0,416$; $p > 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 12-14$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; # interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Na figura 4, observa-se que os valores da pressão arterial diastólica (PAD) nos períodos de vigília em ambos os grupos, controle (PRÉ = $80,0 \pm 1,5$ mmHg; PÓS = $78,7 \pm 1,9$ mmHg; $p > 0,05$) e cirurgia bariátrica (PRÉ = $80,8 \pm 1,8$ mmHg; PÓS = $82,1 \pm 1,9$ mmHg; $p > 0,05$) se mantiveram e não apresentaram alterações após a suplementação com nitrato.

O mesmo ocorreu com a PAD no período de sono no grupo controle (PRÉ = $69,1 \pm 2,5$ mmHg; PÓS = $67,8 \pm 2,5$ mmHg; $p > 0,05$) e cirurgia bariátrica (PRÉ = $71,6 \pm 2,9$ mmHg; PÓS = $72,1 \pm 2,4$ mmHg; $p > 0,05$) que não foi alterada pela suplementação.

Avaliando a PAS e PAD de 24 horas dos voluntários, no grupo controle apenas 2 indivíduos foram considerados hipertensos e no grupo cirurgia apenas 1 indivíduo.

Figura 4 – Pressão arterial diastólica nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) Pressão arterial diastólica no período de vigília. Interação: $F_{1,25} = 3,934$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,25} = 0,331$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,25} = 0,293$; $p > 0,05$. **B)** Pressão arterial diastólica período de sono. Interação: $F_{1,20} = 0,631$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,20} = 0,203$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,20} = 0,239$; $p > 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 10-14$ por grupo). Teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Quanto à pressão arterial média (PAM) vigília, em indivíduos do grupo controle, foi observada uma redução após suplementação com nitrato (PRÉ = $96,9 \pm 1,8$ mmHg; PÓS = $94,3 \pm 2,2$ mmHg; $p < 0,05$), porém o mesmo não ocorreu na PAM sono (PRÉ = $83,8 \pm 3,1$ mmHg; PÓS = $82,9 \pm 3,2$ mmHg; $p > 0,05$) (Figura 5).

No grupo cirurgia bariátrica, não houveram alterações após a suplementação com nitrato na PAM vigília (PRÉ = $98,5 \pm 1,8$ mmHg; PÓS = $99,1 \pm 2,0$ mmHg; $p > 0,05$) e sono (PRÉ = $87,1 \pm 3,3$ mmHg; PÓS = $87,1 \pm 2,6$ mmHg; $p > 0,05$), como observado na Figura 5.

Figura 5 – Pressão arterial média nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) Pressão arterial média no período de vigília. Interação: $F_{1,25} = 2,366$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,25} = 4,261$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,25} = 0,862$; $p > 0,05$. **B)** Pressão arterial média no período de sono. Interação: $F_{1,23} = 0,1805$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,23} = 0,1477$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,23} = 0,8060$; $p > 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 12-14$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Em relação à frequência cardíaca (FC) vigília do grupo controle, foi observada uma redução significativa (PRÉ = $80,8 \pm 2,1$ bpm; PÓS = $77,06 \pm 1,6$ bpm; $p < 0,05$), como demonstrado na Figura 6. Já na FC sono do mesmo grupo, não foi observada alteração (PRÉ = $72,1 \pm 1,5$ bpm; PÓS = $70,8 \pm 1,8$ bpm; $p > 0,05$).

No grupo cirurgia bariátrica, a FC vigília (PRÉ = $80,4 \pm 1,7$ bpm; PÓS = $79,04 \pm 1,5$ bpm; $p > 0,05$) e a FC sono (PRÉ = $69,03 \pm 2,4$ bpm; PÓS = $68,7 \pm 2,1$ bpm; $p > 0,05$) não sofreram alteração (Figura 6).

Figura 6 – Frequência cardíaca nos períodos de vigília e sono dos grupos controle e cirurgia bariátrica analisados durante 24 horas pelo aparelho MAPA, pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) Frequência cardíaca no período de vigília. Interação: $F_{1, 25} = 2,264$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 25} = 10,56$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 25} = 0,140$; $p > 0,05$. **B)** Frequência cardíaca no período de sono. Interação: $F_{1, 23} = 0,336$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 23} = 0,822$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 23} = 0,911$; $p > 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 12-14$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Foram avaliados dois parâmetros funcionais nos voluntários dos grupos de estudo. Endopat, que avalia a função endotelial, e VOP, que avalia a rigidez vascular.

A partir da análise pelo Endopat, foi observada melhora na função endotelial no grupo controle após o tratamento com o extrato de beterraba (PRÉ = $0,70 \pm 0,04$; PÓS = $0,84 \pm 0,05$; $p < 0,05$), uma vez que ocorreu o aumento do índice LnRHI (Figura 7).

Já o grupo cirurgia bariátrica não apresentou melhora na função endotelial após a suplementação (PRÉ = $0,76 \pm 0,05$; PÓS = $0,73 \pm 0,05$; $p > 0,05$) como demonstrado na Figura 7.

Houve interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia no Endopat ($F_{1, 27} = 8,204$; $p < 0,05$; Figura 7), de forma que houve melhora na função endotelial no grupo controle, mas não no grupo de cirurgia bariátrica.

Figura 7 – Endopat pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias (n = 14-15 por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; # interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1,27} = 8,204$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1,27} = 3,722$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,27} = 0,121$; $p > 0,05$.

Após a realização do VOP, (Figura 8) observou-se que a velocidade de onda de pulso carótida-femoral manteve-se a mesma após a suplementação, tanto em voluntários do grupo controle (PRÉ = $5,7 \pm 0,3$; PÓS = $5,6 \pm 0,2$; $p > 0,05$) quanto submetidos à cirurgia bariátrica (PRÉ = $6,3 \pm 0,3$; PÓS = $6,5 \pm 0,3$; $p > 0,05$). Isto nos permite afirmar que a suplementação com nitrato não alterou a rigidez vascular nos 2 grupos do estudo no período estudado.

Figura 8 – VOP pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 13-15$ por grupo). Obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 24} = 0,269$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 24} = 0,021$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 24} = 2,290$; $p > 0,05$.

Uma vez que a suplementação com nitrato melhorou parâmetros de pressão arterial, frequência cardíaca e a função endotelial no grupo controle e o mesmo não ocorreu no grupo cirurgia bariátrica, foram analisadas as concentrações plasmáticas de nitrato, nitrito, S-nitrosotióis (RSNO), espécies nitrosiladas (RXNO) e espécies nitrosiladas resistentes a mercúrio (RNNO) com a finalidade de avaliar a relação dessas espécies com os efeitos observados nos dois grupos de estudo.

Como esperado, os voluntários dos dois grupos do estudo apresentaram aumento de cerca de 5 vezes na concentração plasmática de nitrato após a suplementação com nitrato de sódio. Controle: PRÉ = $0,044 \pm 0,006$ mM; PÓS: $0,216 \pm 0,006$ mM ($p < 0,05$). Bariátrica: PRÉ: $0,057 \pm 0,007$ mM; PÓS: $0,236 \pm 0,007$ mM ($p < 0,05$) (figura 9).

Figura 9 – Nitrito plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 28} = 6,207$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 376,8$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 3,086$; $p > 0,05$.

Na figura 10, pode-se notar aumento da concentração de nitrito plasmático após suplementação com nitrato de sódio no grupo controle (Pré = $0,140 \pm 0,03 \mu\text{M}$; PÓS: $0,438 \pm 0,08 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) e cirurgia bariátrica (Pré = $0,151 \pm 0,03 \mu\text{M}$; PÓS: $1,147 \pm 0,19 \mu\text{M}$; $p < 0,05$).

Além disso, o aumento das concentrações de nitrito plasmático após a suplementação foi menor no grupo controle comparado ao grupo cirurgia, sendo cerca de 4 vezes no grupo controle e 10 vezes no grupo cirurgia bariátrica. Houve interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia no nitrito plasmático, indicando maior aumento das concentrações de nitrito plasmático no grupo cirurgia bariátrica ($F_{1, 27} = 8,204$; $p < 0,05$; Figura 10).

Figura 10 – Nitrito plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento, & $p < 0,05$ pós controle versus pós bariátrica; # interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1,28} = 16,02$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 55,07$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 8,65$; $p < 0,05$.

Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de RSNO, RXNO e RNNO. Como elucidado na metodologia deste trabalho (item 4.7.3), RXNO representa o total de espécies nitrosiladas na amostra, RNNO corresponde às espécies nitrosiladas resistentes a mercúrio (nitrosaminas) e RSNO corresponde aos S-nitrosotióis obtidos pela subtração dos dois primeiros ($RXNO - RNNO = RSNO$).

A suplementação com nitrato de sódio aumentou as concentrações de RSNO (Pré = $0,008 \pm 0,001 \mu M$; PÓS: $0,014 \pm 0,001 \mu M$; $p < 0,05$) e RXNO (Pré = $0,017 \pm 0,002 \mu M$; PÓS: $0,023 \pm 0,002 \mu M$; $p < 0,05$) no plasma do grupo controle. De forma interessante, a suplementação diminuiu a concentração de RSNO (Pré = $0,009 \pm 0,001 \mu M$; PÓS: $0,003 \pm 0,0009 \mu M$; $p < 0,05$) e RXNO (Pré = $0,016 \mu M \pm 0,002$; PÓS: $0,008 \pm 0,001 \mu M$; $p < 0,05$) no grupo cirurgia bariátrica ($p < 0,05$) (Figura 11).

Houve interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia no RSNO plasmático ($F_{1, 28} = 15,97$; $p < 0,05$) e RXNO plasmático ($F_{1, 28} = 14,26$; $p < 0,05$) (Figura 11), de forma que maiores concentrações foram observadas no grupo controle do que no grupo de cirurgia bariátrica após o tratamento.

Figura 11 – RSNO e RXNO plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) RSNO plasmático. Interação: $F_{1, 28} = 15,97$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 0,1618$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 6,864$; $p < 0,05$. **B)** RXNO plasmático. Interação: $F_{1, 28} = 14,26$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 0,188$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 9,470$; $p < 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; & $p < 0,05$ pós controle versus pós bariátrica; # interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Não houve alterações nas concentrações de RNNO plasmático no grupo controle (Pré = $0,009 \pm 0,001 \mu\text{M}$; PÓS: $0,007 \pm 0,001 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) e cirurgia bariátrica (Pré = $0,006 \pm 0,001 \mu\text{M}$; PÓS: $0,004 \pm 0,001 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) após a suplementação (Figura 12).

Figura 12 – RNNO plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). Obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1,28} = 0,011$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 1,730$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 3,849$; $p > 0,05$.

Sabendo-se da importância do ambiente bucal para a via nitrato-nitrito-NO, foram avaliadas as concentrações salivares de nitrato, nitrito, RSNO, RXNO e RNNO.

Os voluntários dos grupos controle e cirurgia bariátrica apresentaram aumentos nas concentrações salivares de nitrato (Controle: PRÉ = $0,34 \pm 0,06$ mM; PÓS: $4,51 \pm 0,55$ mM; $p < 0,05$), (Bariátrica: PRÉ: $0,28 \pm 0,04$ mM; PÓS: $5,06 \pm 0,42$ mM; $p < 0,05$) e nitrito (Controle: PRÉ = $0,24 \pm 0,07$ mM; PÓS: $1,835 \pm 0,36$ mM; $p < 0,05$), (Bariátrica: PRÉ: $0,12 \pm 0,03$ mM; PÓS: $1,89 \pm 0,30$ mM; $p < 0,05$) após a suplementação, como demonstrado na Figura 13 e Figura 14, respectivamente.

Figura 13 – Nitrato salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias (n = 15 por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 28} = 0,786$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 170,2$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 0,479$; $p > 0,05$.

Figura 14 – Nitrito salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 28} = 0,139$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 52,12$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 7,437$; $p > 0,05$.

Observou-se que a suplementação com nitrato de sódio aumentou as concentrações salivares de RSNO, RXNO (Figura 15 A e B) e RNNO (Figura 16 A e B) nos dois grupos avaliados ($p < 0,05$).

A suplementação resultou em menores aumentos das concentrações salivares, no grupo cirurgia bariátrica de RSNO (Pré = $0,27 \pm 0,06 \mu\text{M}$; PÓS: $1,14 \pm 0,16 \mu\text{M}$; $p < 0,05$); RXNO (Pré = $0,31 \pm 0,06 \mu\text{M}$; PÓS: $1,33 \pm 0,16 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) e RNNO (Pré = $0,03 \pm 0,01 \mu\text{M}$; PÓS: $0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) comparado ao grupo controle: RSNO (Pré = $0,59 \pm 0,16 \mu\text{M}$; PÓS: $2,28 \pm 0,46 \mu\text{M}$; $p < 0,05$), RXNO (Pré = $0,64 \pm 0,16 \mu\text{M}$; PÓS: $2,40 \pm 0,47 \mu\text{M}$; $p < 0,05$) e RNNO (Pré = $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$; PÓS: $0,12 \pm 0,02 \mu\text{M}$; $p < 0,05$), (Figura 15 A e B) (Figura 16 A e B).

Figura 15 – RSNO e RXNO salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) RSNO salivar. Interação: $F_{1,28} = 2,601$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 25,27$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 7,437$; $p < 0,05$. **B) RXNO salivar.** Interação: $F_{1,28} = 1,962$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 28,29$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 5,522$; $p < 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; & $p < 0,05$ pós controle versus pós bariátrica; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

Figura 16 – RNO salivar pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; & $p < 0,05$ pós controle versus pós bariátrica; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 28} = 2,601$; $p > 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 25,27$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 7,437$; $p < 0,05$.

Com base nos resultados expostos, foram realizadas correlações para avaliar associação entre as análises funcionais e de pressão arterial com as medidas bioquímicas de nitrito e RSNO plasmático. Em todas as correlações foram analisados em conjunto os dados pré e pós suplementação com nitrato de sódio.

A figura 17 A apresenta a correlação entre a função endotelial e as concentrações de RSNO plasmático e a figura 17 B a correlação entre a função endotelial e as concentrações de nitrito plasmático.

Interessantemente, foi observada correlação positiva entre a função endotelial e RSNO plasmático ($r = 0,373$; $p = 0,003$), porém o mesmo não ocorre com nitrito plasmático ($r = 0,028$; $p = 0,831$).

A **B**

Figura 17 – Correlação entre função endotelial e RSNO plasmático; função endotelial e nitrito plasmático. A) Correlação entre função endotelial e RSNO plasmático. **B)** Correlação entre função endotelial e nitrito plasmático. r = coeficiente de correlação de Pearson ($n = 58$).

Observou-se correlação negativa entre a PAS e as concentrações plasmáticas de RSNO ($r = -0,366$; $p = 0,005$; Figura 18 A), porém o mesmo não ocorre com nitrito plasmático ($r = -0,152$; $p = 0,261$; Figura 18 B).

O mesmo ocorreu entre PAM e as concentrações plasmáticas de RSNO, que apresentaram correlação negativa ($r = -0,313$; $p = 0,018$; Figura 19 A) e nitrito plasmático, que não estão correlacionados ($r = -0,086$; $p = 0,535$; Figura 19 B).

Figura 18 – Correlação entre PAS e RSNO plasmático; PAS e nitrito plasmático. A) Correlação entre PAS e RSNO plasmático. **B)** Correlação entre PAS e nitrito plasmático. r = coeficiente de correlação de Pearson ($n = 56$).

Figura 19 – Correlação entre PAM e RSNO plasmático; PAM e nitrito plasmático. A) Correlação entre PAM e RSNO plasmático. **B)** Correlação entre PAM e nitrito plasmático. r = coeficiente de correlação de Pearson ($n = 56$).

Além disso, entre as concentrações plasmáticas de nitrito e S-nitrosotióis há uma correlação negativa ($r = -0,270$; $p = 0,036$; Figura 20).

Figura 20 – Correlação entre nitrito e RSNO plasmático. r = coeficiente de correlação de Pearson ($n = 60$).

Também foi avaliado se a suplementação com nitrato de sódio altera o estresse oxidativo nos dois grupos de estudo.

Como resultado da suplementação, foi observado, no grupo controle, redução do estresse oxidativo como indicado pela redução das concentrações plasmáticas de malonaldeído (MDA) (Pré = $0,70 \pm 0,05$ nmol/mL; PÓS: $0,54 \pm 0,02$ nmol/mL; $p < 0,05$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pré = $0,11 \pm 0,008$ μ M; PÓS: $0,08 \pm 0,008$ μ M; $p < 0,05$) (Figura 21 A e B).

No grupo cirurgia bariátrica, a concentração de MDA (Pré = $0,55 \pm 0,02$ nmol/mL; PÓS: $0,56 \pm 0,02$ nmol/mL; $p > 0,05$) e H_2O_2 (Pré = $0,09 \pm 0,006$ μ M; PÓS: $0,10 \pm 0,005$ μ M; $p > 0,05$) não foram alterados após a suplementação (Figura 21 A e B).

Há uma interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia no MDA ($F_{1, 26} = 13,98$; $p < 0,05$; Figura 21 A) e H_2O_2 ($F_{1, 26} = 13,67$; $p < 0,05$; Figura 21 B).

Figura 21 – MDA e H₂O₂ plasmático pré e pós 14 dias de suplementação com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. A) MDA plasmático. Interação: $F_{1,28} = 13,98$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 10,16$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 2,231$; $p > 0,05$. B) H₂O₂ plasmático. Interação: $F_{1,28} = 13,67$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1,28} = 7,491$; $p < 0,05$; Cirurgia: $F_{1,28} = 0,008$; $p > 0,05$. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; # Interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia.

A capacidade antioxidante total (CAT) foi avaliada no plasma dos voluntários, uma vez que o estresse oxidativo foi reduzido no grupo controle após a suplementação com nitrato de sódio.

Na figura 22 é possível observar que o tratamento aumentou a CAT do plasma no grupo controle (Pré = $1,56 \pm 0,23$ mM; PÓS: $1,91 \pm 0,31$ mM; $p < 0,05$) e o mesmo não ocorreu no grupo cirurgia bariátrica (Pré = $2,08 \pm 0,2$ mM; PÓS: $1,97 \pm 0,21$ mM; $p > 0,05$; Figura 22)

Há uma interação entre os dois fatores analisados – tratamento e cirurgia na CAT ($F_{1, 26} = 6,582$; $p < 0,05$; Figura 22).

Figura 22 – Capacidade Antioxidante Total (TAC) plasmática pré e pós 14 dias de tratamento com nitrato de sódio em voluntárias dos grupos Controle e Bariátrica. Os dados são mostrados como médias ($n = 15$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pré-tratamento; # Interação; obtidos pelo teste Anova de 2 vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste Bonferroni, sendo os dois fatores: tratamento e a cirurgia. Interação: $F_{1, 28} = 6,582$; $p < 0,05$; Tratamento: $F_{1, 28} = 2,494$; $p > 0,05$; Cirurgia: $F_{1, 28} = 1,022$; $p > 0,05$.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Os principais achados do presente estudo foram que a suplementação dietética com nitrato de sódio resultou em: (I) redução da pressão arterial sistólica, pressão arterial média e a frequência cardíaca, mas não a pressão arterial diastólica, na vigília, em voluntárias saudáveis e essa redução não foi encontrada em voluntárias do grupo cirurgia bariátrica; (II) melhora da função endotelial nas voluntárias saudáveis e não alterou a função endotelial nas voluntárias do grupo cirurgia bariátrica; (III) mesmo aumento na concentração de nitrato plasmático em ambos os grupos; (IV) aumento na concentração plasmática de nitrito nos dois grupos e esse aumento foi menor no grupo controle; (V) aumento da concentração plasmática de RSNO e RXNO em voluntárias do grupo controle e diminuição em voluntárias do grupo cirurgia bariátrica; (VI) níveis plasmáticos de S-nitrosotióis que se correlacionam negativamente com os níveis de nitrito plasmático, valores de pressão arterial sistólica e pressão arterial média, observados antes e após a suplementação com nitrato (VII) níveis de S-nitrosotióis que se correlacionam positivamente com os valores de função endotelial observados antes e após a suplementação com nitrato; (VIII) aumento de nitrito e nitrato salivar em ambos os grupos; (IX) aumento mais pronunciado do RSNO e RXNO salivar em indivíduos do grupo controle que no grupo cirurgia bariátrica; (X) redução do estresse oxidativo no grupo controle e não no grupo cirurgia bariátrica; (XI) melhora na capacidade antioxidante total no grupo controle e não no grupo cirurgia bariátrica.

Diversos estudos clínicos têm avaliado os efeitos terapêuticos do nitrato e nitrito inorgânico na saúde cardiovascular de indivíduos normotensos e hipertensos. Entre eles há conflitos em relação às respostas pressóricas resultantes desse tratamento (SIERVO; LARA; OGBONMWAN; MATHERS, 2013). No presente trabalho, a suplementação dietética com nitrato de sódio durante 14 dias em indivíduos saudáveis e majoritariamente normotensos, resultou em redução da PAS de cerca de 6 mmHg, redução da PAM, porém não alterou a PAD em indivíduos controle durante a vigília.

Estudos de Larsen et al. e Webb et al. demonstraram que a suplementação com nitrato de sódio durante 3 dias (0,1 mmol/kg/dia) e uma dose de suco de beterraba (500 mL), respectivamente, reduziram a pressão arterial sistólica e diastólica em indivíduos saudáveis (LARSEN; EKBLOM; SAHLIN; LUNDBERG *et al.*, 2006; WEBB; PATEL; LOUKOGEORGAKIS; OKORIE *et al.*, 2008). Um estudo de intervenção com nitrito de sódio por 10 semanas não indicou alteração na pressão arterial (DEVAN; JOHNSON; BROOKS; EVANS *et al.*, 2016).

Stomberski et al, ao comparar adultos jovens e idosos observaram que os idosos apresentaram maior redução da PAD após suplementação aguda com suco de beterraba (10,5 mmol de nitrato), o que pode explicar ausência de redução de PAD no presente estudo, uma vez que, a média de idade foi de 41 anos (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019). Nossos achados também são consistentes com dados de uma meta-análise que constatou uma redução na PAS de 4,4 mmHg e redução mais modesta na PAD (-1,1 mmHg) (SIERVO; LARA; OGBONMWAN; MATHERS, 2013).

De qualquer maneira, há que se observar que qualquer droga anti-hipertensiva tem maior dificuldade em reduzir a pressão arterial em indivíduos

normotensos que em hipertensos. Esta regra geral pode ser aplicada ao contexto em que foi realizado o presente estudo.

O estômago possui um papel central na via nitrato-nitrito-NO, uma vez que, o ambiente ácido é imprescindível para a química gástrica que forma NO e S-nitrosotióis, a partir do nitrito (ROCHA; GAGO; PEREIRA; BARBOSA *et al.*, 2011). De fato, foi demonstrado nessa tese que a drástica redução do volume gástrico pela cirurgia bariátrica, anula a redução da pressão arterial promovido pela suplementação com nitrato. Essa perda do efeito parece ser resultante da diminuição da exposição do nitrito ao ambiente ácido gástrico, um vez que as alterações anatômicas induzidas pela cirurgia assim o condicionam. Além disso, o pH gástrico é aumentado como resultado dessa alteração anatômica (PORAT; VAYNSHTEIN; GIBORI; AVRAMOFF *et al.*, 2021).

Estes achados estão em concordância com estudos experimentais e clínico que demonstraram que o aumento farmacológico do pH gástrico, com IBPs e antagonista de receptor H₂, resulta em prejuízo do efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio (MONTENEGRO; SUNDQVIST; LARSEN; ZHUGE *et al.*, 2017; PINHEIRO; MONTENEGRO; AMARAL; FERREIRA *et al.*, 2012; SANCHES-LOPES; FERREIRA; PINHEIRO; KEMP *et al.*, 2020). Além disso, foi observado que o aumento não farmacológico do pH gástrico, utilizando tampões, também interfere nesse efeito (SANCHES-LOPES; FERREIRA; PINHEIRO; KEMP *et al.*, 2020).

O prejuízo no efeito anti-hipertensivo do nitrito/ nitrato está relacionado à diminuição da formação de NO e também de S-nitrosotióis (PINHEIRO; AMARAL; FERREIRA; PORTELLA *et al.*, 2015; PINHEIRO; FERREIRA; AMARAL; PORTELLA *et al.*, 2016). Nesse estudo, essa relação também foi constatada. O aumento na concentração de espécies nitrosiladas e S-nitrosotióis na saliva e no plasma dos

indivíduos com o ambiente gástrico inalterado, não foi encontrado no plasma de pacientes que realizaram a cirurgia. Também na saliva esse aumento foi menor que nos indivíduos controle. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a PAS e PAM e S-nitrosotióis, evidenciando a importância desses mediadores vasoativos na redução da pressão arterial. Também foi observada maior concentração de nitrito plasmático no grupo cirurgia que no grupo controle, após a suplementação, e esse acúmulo de nitrito é mais um indício de que a conversão gástrica do nitrito foi comprometida com a redução do volume estomacal.

A relação dos S-nitrosotióis e a redução da pressão arterial pode ser associada a reações de transnitrosilação que promovem S-nitrosilação de proteínas importantes para a resposta pressórica, alterando suas funções e efeitos (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001). Já foi demonstrado que o tratamento com nitrito oral promove S-nitrosilação da proteína quinase C (PKC), crítica na regulação da função vascular, que resulta em inibição da atividade enzimática, menos fosforilação de proteínas e inibição da vasoconstrição (CHOI; TOSTES; WEBB, 2011; PINHEIRO; OLIVEIRA-PAULA; FERREIRA; DAL-CIN DE PAULA *et al.*, 2021).

A disfunção endotelial, rigidez vascular e o estresse oxidativo são importantes alterações envolvidas na patogênese das doenças cardiovasculares (INCALZA; D'ORIA; NATALICCHIO; PERRINI *et al.*, 2018). Nesse contexto, o tratamento *in vivo* com nitrato e nitrito inorgânico melhora a função endotelial, como demonstrado em modelos experimentais de hipertensão arterial (LING; MURUGAN; LAU; VANHOUTTE *et al.*, 2016; STAMM; OELZE; STEVEN; KROLLER-SCHON *et al.*, 2021). Corroborando esses achados, intervenções dietéticas com nitrato inorgânico em estudos clínicos mostraram melhora da função endotelial em indivíduos saudáveis e hipertensos (BONDONNO; CROFT; HODGSON, 2016; JONES; DUNN;

MACDONALD; KUBIS *et al.*, 2019; KAPIL; KHAMBATA; ROBERTSON; CAULFIELD *et al.*, 2015). No presente estudo, também foi observada melhora da função endotelial em voluntários controles após suplementação, porém a cirurgia bariátrica impediu esse efeito vascular. A melhora da função endotelial está relacionada ao aumento da biodisponibilidade de NO (CYR; HUCKABY; SHIVA; ZUCKERBRAUN, 2020). Os S-nitrosotióis também parecem mediar esses efeitos, uma vez que, foi encontrada uma correlação positiva entre a melhora da função endotelial e a concentração plasmática de S-nitrosotióis. Este pode realizar seus efeitos por liberar NO ou por S-nitrosilar proteínas alvo importantes (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001).

Já foi demonstrado que em indivíduos hipertensos, o nitrato inorgânico na dieta melhora a rigidez vascular após 4 semanas (KAPIL; KHAMBATA; ROBERTSON; CAULFIELD *et al.*, 2015). Além disso, a suplementação no mesmo período melhora a rigidez vascular em voluntários idosos (RAMMOS; HENDGEN-COTTA; SOBIERAJSKI; BERNARD *et al.*, 2014). Contudo, no presente estudo a suplementação não alterou a rigidez vascular nos dois grupos avaliados, o que pode ser atribuído a população do estudo que consiste em voluntários saudáveis ou ao tempo de 14 semanas que pode não ter sido suficiente para acarretar nessas alterações.

Diversos trabalhos demonstraram que o tratamento com nitrito e nitrato inorgânico reduz os níveis circulantes e vasculares de estresse oxidativo em modelos animais de hipertensão (AMARAL; FERREIRA; PINHEIRO; MONTENEGRO *et al.*, 2015; MONTENEGRO; AMARAL; PINHEIRO; SAKAMOTO *et al.*, 2011; MONTENEGRO; PINHEIRO; AMARAL; MARCAL *et al.*, 2012; MUNZEL; DAIBER, 2018). Embora esse efeito já tenha sido mostrado em modelos animais, não é bem esclarecido em estudos clínicos. A suplementação aguda com nitrato de sódio (6,2 mmol) não alterou o estresse oxidativo (CARRIKER; HARRISON;

BOCKOVER; RATCLIFFE *et al.*, 2019). Adicionalmente, 5 dias de suplementação com nitrato (10 mg/kg/dia) reduziu TBARS circulante e melhorou a atividade antioxidante total (MENEZES; PEIXOTO; TEIXEIRA; JUSTINO *et al.*, 2019).

No presente estudo, em concordância com esse último, a suplementação com nitrato resultou em redução do estresse oxidativo, da peroxidação lipídica (TBARS) e aumentou a capacidade antioxidante total. Essa melhora pode estar relacionada ao aumento da biodisponibilidade de NO resultante da suplementação da via nitrato-nitrito-NO (WINK; MIRANDA; ESPEY; PLUTA *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento não alterou esses marcadores no grupo bariátrica, que demonstra a importância do pH ácido do estômago e a subsequente formação de NO e S-nitrosotióis para os efeitos do nitrato de sódio no estresse oxidativo.

Como a cirurgia bariátrica altera a anatomia do estômago e também do intestino, seria possível que essa diminuição dos efeitos observados fosse resultado da diminuição da absorção de nitrato (COLLARES-PELIZARO; SANTOS; NONINO; GAITANI *et al.*, 2017). Contudo essa afirmação é contestada ao analisar a concentração plasmática de nitrato em ambos os grupos e observar que a suplementação com nitrato resultou no mesmo aumento plasmático e salivar de nitrato em ambos os grupos. De fato, em situações normais a biodisponibilidade do nitrato é de cerca de 100% e a cirurgia parece não ter diminuído a sua absorção (VAN VELZEN; SIPS; SCHOTHORST; LAMBERS *et al.*, 2008).

Juntos, esses achados demonstram que a suplementação com nitrato de sódio reduz a pressão arterial, melhora a função endotelial e melhora o estresse oxidativo em voluntários saudáveis e reforçam a importância da participação do pH ácido gástrico nos efeitos anti-hipertensivos e no sistema cardiovascular da suplementação da via e a relação dos S-nitrosotióis com esses efeitos.

CONCLUSÕES

A cirurgia bariátrica prejudica a via nitrato-nitrito-NO, por reduzir a exposição do nitrito ao pH ácido do estômago, bloqueando os efeitos anti-hipertensivos, na função endotelial, no estresse oxidativo e na capacidade antioxidante promovidos pela suplementação com nitrato de sódio em indivíduos que apresentam a anatomia gástrica inalterada. Esses efeitos mais uma vez se mostraram ser dependentes da formação gástrica de S-nitrosotióis, o que sugere um mecanismo bioquímico que parece estar criticamente envolvido nestas respostas.

Esses achados são importantes para a avaliação clínica da suplementação desses pacientes com nitrato e nitrito inorgânico, uma vez que os efeitos cardiovasculares do tratamento não são efetivos em pacientes que fizeram a cirurgia bariátrica.

REFERÊNCIAS

Referências

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.
- ALBAUGH, V. L.; BANAN, B.; AJOUZ, H.; ABUMRAD, N. N. *et al.* Bile acids and bariatric surgery. **Mol Aspects Med**, 56, p. 75-89, Aug 2017.
- ALKAITIS, M. S.; CRABTREE, M. J. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. **Curr Heart Fail Rep**, 9, n. 3, p. 200-210, Sep 2012.
- AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F. *et al.* Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biol**, 5, p. 340-346, Aug 2015.
- AMARAL, J. H.; RIZZI, E. S.; ALVES-LOPES, R.; PINHEIRO, L. C. *et al.* Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. **Free Radic Biol Med**, 141, p. 261-268, Sep 2019.
- ANAND, P.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **J Mol Med (Berl)**, 90, n. 3, p. 233-244, Mar 2012.
- AXTELL, A. L.; GOMARI, F. A.; COOKE, J. P. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. **J Vis Exp**, n. 44, Oct 15 2010.
- BAILEY, S. J.; FULFORD, J.; VANHATALO, A.; WINYARD, P. G. *et al.* Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **J Appl Physiol (1985)**, 109, n. 1, p. 135-148, Jul 2010.
- BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F.; DOUGALL, H.; DUNCAN, C. *et al.* Stomach NO synthesis. **Nature**, 368, n. 6471, p. 502, Apr 7 1994.
- BJORNE, H.; GOVONI, M.; TORNERG, D. C.; LUNDBERG, J. O. *et al.* Intra gastric nitric oxide is abolished in intubated patients and restored by nitrite. **Crit Care Med**, 33, n. 8, p. 1722-1727, Aug 2005.
- BONDONNO, C. P.; CROFT, K. D.; HODGSON, J. M. Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 56, n. 12, p. 2036-2052, Sep 9 2016.
- BULT, M. J.; VAN DALEN, T.; MULLER, A. F. Surgical treatment of obesity. **Eur J Endocrinol**, 158, n. 2, p. 135-145, Feb 2008.
- CARLSTROM, M.; PERSSON, A. E.; LARSSON, E.; HEZEL, M. *et al.* Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovasc Res**, 89, n. 3, p. 574-585, Feb 15 2011.
- CARRIKER, C. R.; HARRISON, C. D.; BOCKOVER, E. J.; RATCLIFFE, B. J. *et al.* Acute dietary nitrate does not reduce resting metabolic rate or oxidative stress marker 8-isoprostane in healthy males and females. **Int J Food Sci Nutr**, 70, n. 7, p. 887-893, Nov 2019.
- CHOI, H.; TOSTES, R. C.; WEBB, R. C. S-nitrosylation Inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, 57, n. 1, p. 65-71, Jan 2011.

COLLARES-PELIZARO, R. V. A.; SANTOS, J. S.; NONINO, C. B.; GAITANI, C. M. *et al.* Omeprazole Absorption and Fasting Gastrinemia After Roux-en-Y Gastric Bypass. **Obes Surg**, 27, n. 9, p. 2303-2307, Sep 2017.

COOKE, J. P. NO and angiogenesis. **Atheroscler Suppl**, 4, n. 4, p. 53-60, Dec 2003.

COSBY, K.; PARTOVI, K. S.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P. *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nat Med**, 9, n. 12, p. 1498-1505, Dec 2003.

CYR, A. R.; HUCKABY, L. V.; SHIVA, S. S.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Crit Care Clin**, 36, n. 2, p. 307-321, Apr 2020.

DEMARTINO, A. W.; KIM-SHAPIRO, D. B.; PATEL, R. P.; GLADWIN, M. T. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. **Br J Pharmacol**, 176, n. 2, p. 228-245, Jan 2019.

DEVAN, A. E.; JOHNSON, L. C.; BROOKS, F. A.; EVANS, T. D. *et al.* Effects of sodium nitrite supplementation on vascular function and related small metabolite signatures in middle-aged and older adults. **J Appl Physiol (1985)**, 120, n. 4, p. 416-425, Feb 15 2016.

DRESSMAN, J. B.; VERTZONI, M.; GOUMAS, K.; REPPAS, C. Estimating drug solubility in the gastrointestinal tract. **Adv Drug Deliv Rev**, 59, n. 7, p. 591-602, Jul 30 2007.

DUPLAIN, H.; BURCELIN, R.; SARTORI, C.; COOK, S. *et al.* Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, 104, n. 3, p. 342-345, Jul 17 2001.

FORSTERMANN, U.; LI, H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. **Br J Pharmacol**, 164, n. 2, p. 213-223, Sep 2011.

FOSTER, M. W.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. **Trends Mol Med**, 15, n. 9, p. 391-404, Sep 2009.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D.; SIBLEY, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev**, 62, n. 3, p. 525-563, Sep 2010.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288, n. 5789, p. 373-376, Nov 27 1980.

GAO, X.; YANG, T.; LIU, M.; PELELI, M. *et al.* NADPH oxidase in the renal microvasculature is a primary target for blood pressure-lowering effects by inorganic nitrate and nitrite. **Hypertension**, 65, n. 1, p. 161-170, Jan 2015.

GILCHRIST, M.; WINYARD, P. G.; AIZAWA, K.; ANNING, C. *et al.* Effect of dietary nitrate on blood pressure, endothelial function, and insulin sensitivity in type 2 diabetes. **Free Radic Biol Med**, 60, p. 89-97, Jul 2013.

GOLZARAND, M.; BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; ZADEH-VAKILI, A. *et al.* Consumption of nitrate-containing vegetables is inversely associated with hypertension in adults: a prospective investigation from the Tehran Lipid and Glucose Study. **J Nephrol**, 29, n. 3, p. 377-384, Jun 2016.

HAAS, M.; CLASSEN, H. G.; THONI, H.; CLASSEN, U. G. *et al.* Persistent antihypertensive effect of oral nitrite supplied up to one year via the drinking water in spontaneously hypertensive rats. **Arzneimittelforschung**, 49, n. 4, p. 318-323, Apr 1999.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S. O.; MARSHALL, H. E. *et al.* Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 6, n. 2, p. 150-166, Feb 2005.

HOBBS, D. A.; KAFFA, N.; GEORGE, T. W.; METHVEN, L. *et al.* Blood pressure-lowering effects of beetroot juice and novel beetroot-enriched bread products in normotensive male subjects. **Br J Nutr**, 108, n. 11, p. 2066-2074, Dec 14 2012.

HOGG, N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. **Free Radic Biol Med**, 28, n. 10, p. 1478-1486, May 15 2000.

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**, 90, n. 1, p. 1-10, Jul 2009.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec 1987.

INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul Pharmacol**, 100, p. 1-19, Jan 2018.

JACKSON, J.; PATTERSON, A. J.; MACDONALD-WICKS, L.; MCEVOY, M. The role of inorganic nitrate and nitrite in CVD. **Nutr Res Rev**, 30, n. 2, p. 247-264, Dec 2017.

JAIN, S.; GURUBHAGAVATULA, I.; TOWNSEND, R.; KUNA, S. T. *et al.* Effect of CPAP, Weight Loss, or CPAP Plus Weight Loss on Central Hemodynamics and Arterial Stiffness. **Hypertension**, 70, n. 6, p. 1283-1290, Dec 2017.

JONES, T.; DUNN, E. L.; MACDONALD, J. H.; KUBIS, H. P. *et al.* The Effects of Beetroot Juice on Blood Pressure, Microvascular Function and Large-Vessel Endothelial Function: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study in Healthy Older Adults. **Nutrients**, 11, n. 8, Aug 2 2019.

KAPIL, V.; KHAMBATA, R. S.; ROBERTSON, A.; CAULFIELD, M. J. *et al.* Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. **Hypertension**, 65, n. 2, p. 320-327, Feb 2015.

KAPIL, V.; MILSOM, A. B.; OKORIE, M.; MALEKI-TOYSERKANI, S. *et al.* Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. **Hypertension**, 56, n. 2, p. 274-281, Aug 2010.

KAPIL, V.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O.; AHLUWALIA, A. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. **Nitric Oxide**, 38, p. 45-57, Apr 30 2014.

KAPOOR, N.; AL-NAJIM, W.; LE ROUX, C. W.; DOCHERTY, N. G. Shifts in Food Preferences After Bariatric Surgery: Observational Reports and Proposed Mechanisms. **Curr Obes Rep**, 6, n. 3, p. 246-252, Sep 2017.

KHATRI, J.; MILLS, C. E.; MASKELL, P.; ODONGEREL, C. *et al.* It is rocket science - why dietary nitrate is hard to 'beet'! Part I: twists and turns in the realization of the nitrate-nitrite-NO pathway. **Br J Clin Pharmacol**, 83, n. 1, p. 129-139, Jan 2017.

LARSEN, F. J.; EKBLOM, B.; SAHLIN, K.; LUNDBERG, J. O. *et al.* Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. **N Engl J Med**, 355, n. 26, p. 2792-2793, Dec 28 2006.

LARSEN, F. J.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O.; EKBLOM, B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. **Acta Physiol (Oxf)**, 191, n. 1, p. 59-66, Sep 2007.

LE ROUX, C. W.; HENEGHAN, H. M. Bariatric Surgery for Obesity. **Med Clin North Am**, 102, n. 1, p. 165-182, Jan 2018.

LING, W. C.; MURUGAN, D. D.; LAU, Y. S.; VANHOUTTE, P. M. *et al.* Sodium nitrite exerts an antihypertensive effect and improves endothelial function through activation of eNOS in the SHR. **Sci Rep**, 6, p. 33048, Sep 12 2016.

LING, W. C.; MUSTAFA, M. R.; VANHOUTTE, P. M.; MURUGAN, D. D. Chronic administration of sodium nitrite prevents hypertension and protects arterial endothelial function by reducing oxidative stress in angiotensin II-infused mice. **Vascul Pharmacol**, 102, p. 11-20, Mar 2018.

LUNDBERG, J. O.; CARLSTROM, M.; WEITZBERG, E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. **Cell Metab**, 28, n. 1, p. 9-22, Jul 3 2018.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, 37, n. 3, p. 395-400, Aug 1 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; COLE, J. A.; BENJAMIN, N. Nitrate, bacteria and human health. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 7, p. 593-602, Jul 2004.

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

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. **Gut**, 35, n. 11, p. 1543-1546, Nov 1994.

MATTHYS, K. E.; BULT, H. Nitric oxide function in atherosclerosis. **Mediators Inflamm**, 6, n. 1, p. 3-21, 1997.

MCKNIGHT, G. M.; SMITH, L. M.; DRUMMOND, R. S.; DUNCAN, C. W. *et al.* Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. **Gut**, 40, n. 2, p. 211-214, Feb 1997.

MENEZES, E. F.; PEIXOTO, L. G.; TEIXEIRA, R. R.; JUSTINO, A. B. *et al.* Potential Benefits of Nitrate Supplementation on Antioxidant Defense System and Blood Pressure Responses after Exercise Performance. **Oxid Med Cell Longev**, 2019, p. 7218936, 2019.

MILLER, A. D.; SMITH, K. M. Medication and nutrient administration considerations after bariatric surgery. **Am J Health Syst Pharm**, 63, n. 19, p. 1852-1857, Oct 01 2006.

MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, 28, p. 97-99, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handb Exp Pharmacol**, n. 176 Pt 1, p. 213-254, 2006.

MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; PINHEIRO, L. C.; SAKAMOTO, E. K. *et al.* Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free Radic Biol Med**, 51, n. 1, p. 144-152, Jul 1 2011.

MONTENEGRO, M. F.; PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; MARCAL, D. M. *et al.* Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 385, n. 5, p. 509-517, May 2012.

MONTENEGRO, M. F.; SUNDQVIST, M. L.; LARSEN, F. J.; ZHUGE, Z. *et al.* Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. **Hypertension**, 69, n. 1, p. 23-31, Jan 2017.

MORENO, H., JR.; METZE, K.; BENTO, A. C.; ANTUNES, E. *et al.* Chronic nitric oxide inhibition as a model of hypertensive heart muscle disease. **Basic Res Cardiol**, 91, n. 3, p. 248-255, May-Jun 1996.

MUNZEL, T.; DAIBER, A. Inorganic nitrite and nitrate in cardiovascular therapy: A better alternative to organic nitrates as nitric oxide donors? **Vascul Pharmacol**, 102, p. 1-10, Mar 2018.

NETO-NEVES, E. M.; PINHEIRO, L. C.; NOGUEIRA, R. C.; PORTELLA, R. L. *et al.* Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. **J Mol Cell Cardiol**, 134, p. 40-50, Sep 2019.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95, n. 2, p. 351-358, Jun 1979.

OLIVEIRA-PAULA, G. H.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitrite-stimulated Gastric Formation of S-nitrosothiols As An Antihypertensive Therapeutic Strategy. **Curr Drug Targets**, 20, n. 4, p. 431-443, 2019.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327, n. 6122, p. 524-526, Jun 11-17 1987.

PAOLOCCI, N.; BIONDI, R.; BETTINI, M.; LEE, C. I. *et al.* Oxygen radical-mediated reduction in basal and agonist-evoked NO release in isolated rat heart. **J Mol Cell Cardiol**, 33, n. 4, p. 671-679, Apr 2001.

PELLETIER, M. M.; KLEINBONGARD, P.; RINGWOOD, L.; HITO, R. *et al.* The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. **Free Radic Biol Med**, 41, n. 4, p. 541-548, Aug 15 2006.

PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PORTELLA, R. L. *et al.* Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, 87, p. 252-262, Oct 2015.

PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; AMARAL, J. H.; PORTELLA, R. L. *et al.* Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect. **Free Radic Biol Med**, 101, p. 226-235, Dec 2016.

PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C. *et al.* Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radic Biol Med**, 53, n. 4, p. 701-709, Aug 15 2012.

PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; FERREIRA, G. C.; DAL-CIN DE PAULA, T. *et al.* Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. **Redox Biol**, 38, p. 101769, Jan 2021.

PORAT, D.; DAHAN, A. Medication Management after Bariatric Surgery: Providing Optimal Patient Care. **J Clin Med**, 9, n. 5, May 17 2020.

PORAT, D.; VAYNSHTEIN, J.; GIBORI, R.; AVRAMOFF, O. *et al.* Stomach pH before vs. after different bariatric surgery procedures: Clinical implications for drug delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, 160, p. 152-157, Mar 2021.

RAMMOS, C.; HENDGEN-COTTA, U. B.; SOBIERAJSKI, J.; BERNARD, A. *et al.* Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. **J Am Coll Cardiol**, 63, n. 15, p. 1584-1585, Apr 22 2014.

ROCHA, B. S.; GAGO, B.; PEREIRA, C.; BARBOSA, R. M. *et al.* Dietary nitrite in nitric oxide biology: a redox interplay with implications for pathophysiology and therapeutics. **Curr Drug Targets**, 12, n. 9, p. 1351-1363, Aug 2011.

SANCHES-LOPES, J. M.; FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; KEMP, R. *et al.* Consistent gastric pH-dependent effects of suppressors of gastric acid secretion on the antihypertensive responses to oral nitrite. **Biochem Pharmacol**, 177, p. 113940, Jul 2020.

SCHIFFER, T. A.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; CARLSTROM, M. Modulation of mitochondria and NADPH oxidase function by the nitrate-nitrite-NO pathway in metabolic disease with focus on type 2 diabetes. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 8, p. 165811, Aug 1 2020.

SIERVO, M.; LARA, J.; OGBONMWAN, I.; MATHERS, J. C. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. **J Nutr**, 143, n. 6, p. 818-826, Jun 2013.

SOBKO, T.; MARCUS, C.; GOVONI, M.; KAMIYA, S. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. **Nitric Oxide**, 22, n. 2, p. 136-140, Feb 15 2010.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. **Food Cosmet Toxicol**, 14, n. 6, p. 545-548, Dec 1976.

STAMLER, J. S. Redox Signaling - Nitrosylation and Related Target Interactions of Nitric-Oxide. **Cell**, 78, n. 6, p. 931-936, Sep 23 1994.

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, 106, n. 6, p. 675-683, Sep 21 2001.

STAMM, P.; OELZE, M.; STEVEN, S.; KROLLER-SCHON, S. *et al.* Direct comparison of inorganic nitrite and nitrate on vascular dysfunction and oxidative damage in experimental arterial hypertension. **Nitric Oxide**, 113-114, p. 57-69, Sep 1 2021.

STOMBERSKI, C. T.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. **Antioxid Redox Signal**, 30, n. 10, p. 1331-1351, Apr 1 2019.

VAN VELZEN, A. G.; SIPS, A. J.; SCHOTHORST, R. C.; LAMBERS, A. C. *et al.* The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. **Toxicol Lett**, 181, n. 3, p. 177-181, Oct 1 2008.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; TANG, E. H.; FELETOU, M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**, 196, n. 2, p. 193-222, Jun 2009.

WEBB, A. J.; PATEL, N.; LOUKOGEORGAKIS, S.; OKORIE, M. *et al.* Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, 51, n. 3, p. 784-790, Mar 2008.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Novel aspects of dietary nitrate and human health. **Annu Rev Nutr**, 33, p. 129-159, 2013.

WESTLING, A.; GUSTAVSSON, S. Laparoscopic vs open Roux-en-Y gastric bypass: a prospective, randomized trial. **Obes Surg**, 11, n. 3, p. 284-292, Jun 2001.

WINK, D. A.; MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; PLUTA, R. M. *et al.* Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. **Antioxid Redox Signal**, 3, n. 2, p. 203-213, Apr 2001.

YANG, B. K.; VIVAS, E. X.; REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. **Free Radic Res**, 37, n. 1, p. 1-10, Jan 2003.

YU, E. W. Bone metabolism after bariatric surgery. **J Bone Miner Res**, 29, n. 7, p. 1507-1518, Jul 2014.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci**, 129, n. 2, p. 83-94, Oct 2015.

ANEXOS

ANEXOS

1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Efeitos da alteração da cirurgia bariátrica nos efeitos do nitrato oral

Responsáveis:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP)

Prof. Dr.: Rafael Kemp (HC-FMRP-USP)

Prof. Dr.: Wilson Salgado Junior (HC-FMRP-USP)

Prof. Dr.: Eduardo Barbosa Coelho (HC-FMRP-USP)

Ms. Jéssica Maria Sanches Lopes - Pós-graduanda (FMRP-USP)

A senhora está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso a senhora não aceite participar da pesquisa, não será penalizado de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

Os detalhes da pesquisa são:

1) Por que esta pesquisa está sendo feita?

As doenças do coração e vasos são bastante comuns entre os adultos. Essas doenças atacam os vasos sanguíneos. Eles são revestidos por uma camada interna que protege os vasos pela produção de uma substância chamada óxido nítrico. Para a produção desta substância nos vasos é preciso que o estômago transforme alguns elementos de nossa dieta. Quando comemos alimentos como beterraba, espinafre, alface eles possuem nitrato que é transformado em óxido nítrico, ajudando então na proteção dos vasos. Para que ocorra esta transformação, é preciso que a acidez do estômago esteja funcionando bem. Em pacientes que fizeram a cirurgia bariátrica, ou seja, tiveram o estômago diminuído, a acidez do estômago está diminuída e assim esses pacientes podem perder essa proteção vinda dos alimentos que comemos. Nós não sabemos se isso realmente acontece, por esse motivo estamos convidando você a participar desta pesquisa para analisarmos se realmente os pacientes que fizeram a cirurgia de redução do estômago tem uma diminuição da proteção dos vasos vinda da alimentação. Assim, nesse trabalho vamos estudar dois grupos de pessoas. Pessoas que fizeram a cirurgia de redução do estômago e comparar com pessoas que não passaram pela cirurgia. É importante estudar pessoas que não passaram pela cirurgia, porque podemos comparar com o que acontece com as pessoas que fizeram a cirurgia. **Você fará parte do grupo controle.**

2) Sua participação neste estudo será:

Se você concordar em participar da pesquisa, você irá passar por uma consulta inicial onde será realizada uma avaliação médica geral, a medida da pressão arterial e análise de parâmetros laboratoriais de rotina. Você será informado para evitar comer vegetais ou alimentos ricos em nitratos e não utilizar enxaguante bucal durante o período do experimento. No dia combinado você terá que fazer 12h de jejum e às 7h ir a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP), e iremos coletar 30 mL de sangue da veia do seu braço (cerca de 2 colheres de sopa) para dosar as substâncias que mostram como

está a saúde dos seus vasos sanguíneos e coletaremos sua saliva (cerca de 1 colher de sopa). Faremos ainda dois testes com você. Um será o endopat, exame que mede a capacidade dos vasos se dilatarem. Este exame é simples e usa um sensor semelhante a um prendedor de roupas que fica na ponta do dedo indicador e um manguito parecido com o de um aparelho de medir pressão. Nós vamos inflar o manguito por 5 minutos no seu braço e medir a vermelhidão que acontece quando o manguito é desinsuflado. Este exame causa um desconforto pelo aperto do braço, mas é inofensivo para você. O outro será o VOP que vai ver a velocidade da onda de pulso (VOP), ou seja, a saúde da sua artéria, para isso você estará deitado e será colocada uma borrachinha sensível a sua pressão no seu pescoço e na sua perna. Este exame não causa nenhum desconforto. Também vamos começar um exame de monitorização da pressão arterial por 24h (MAPA). Neste exame, você terá as medidas de pressão feitas de forma automática a cada 15 minutos durante o dia e 30 minutos durante a noite. Neste dia você não poderá tomar banho e o aparelho pode trazer desconforto durante as medidas.

Na manhã seguinte após colocar o MAPA, você vai voltar a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para devolver o equipamento de MAPA e você vai tomar, pela primeira vez, o extrato de beterraba que iremos te dar em saquinhos que devem ser dissolvidos em água. Nesse dia, vamos te ensinar como dissolver e tomar de forma correta e você ficará em observação por 4 horas para termos certeza que você ficará bem. Você tomará por 14 dias no período da manhã o extrato de beterraba que iremos te dar em saquinhos que devem ser dissolvidos em água da mesma forma que você fez no primeiro dia. No 14º dia você terá que realizar 12h de jejum e às 7h voltar novamente na Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para tomar o último saquinho de extrato de beterraba e repetirmos os dois testes. Vamos retirar mais 30 mL de sangue e coletar sua saliva, e será colocado o MAPA, tudo como no primeiro dia. No dia seguinte pela manhã, você voltará a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para devolver o aparelho MAPA e nesse dia sua participação no estudo terminará.

Com a medida da sua pressão, o seu sangue, sua saliva e os 2 testes pretendemos estudar como a alimentação com a beterraba pode modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo e presentes no seu sangue. Isto nos ajudará no entendimento das mudanças que acontecem depois da tomar o extrato de beterraba.

Seu sangue e saliva ficarão guardados no Departamento de Farmacologia para possível repetição de análise.

3) Pode haver pequenos riscos e desconfortos relacionados à coleta do sangue, ainda que raros e passageiros, como dor no local da coleta, hematoma e tontura. Pode haver pequenos riscos de redução da pressão arterial e tontura ao tomar o extrato de beterraba. A coleta de sangue será realizada por um enfermeiro treinado, o que diminui os riscos relacionados à coleta. Se houver algum tipo desses problemas, os profissionais responsáveis pela coleta são habilitados a resolvê-los. Este volume de sangue coletado é cerca de 2,5 vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todo o estudo laboratorial mencionado acima.

4) **NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA ESTUDO.** Indiretamente, acreditamos

que este estudo trará como benefício um entendimento das alterações hemodinâmicas decorrentes da ingestão do extrato de beterraba.

5) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso ocorram gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntária desta pesquisa, como por exemplo, gastos com transporte no valor de 30,00 a cada visita.

6) A paciente que venha participar dessa pesquisa em nível de pós-graduação, tem direito a indenização caso haja algum dano decorrente da pesquisa de acordo com as leis vigentes no país.

7) Você possui o tempo que for necessário para a tomada de uma decisão autônoma se quer participar do estudo e tem liberdade de recusar em participar da pesquisa.

8) É garantido o seu sigilo e privacidade. Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade das voluntárias nela envolvidos.

9) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

10) A qualquer momento durante o estudo a senhora tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

11) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o procedimento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou a Pós-graduanda Jéssica Maria Sanches Lopes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). As voluntárias podem tirar qualquer dúvidas com o Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos e a aluna Jéssica Maria Sanches Lopes, no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Avenida Bandeirantes, 3900 – Bairro Monte Alegre – Ribeirão Preto-SP no período entre 8h às 17h. Telefone para contato nesse período é (16) 3315-3163 ou (16) 3315-3040. Se houver urgência, telefone 24h / 7 dias: (16) 99797-3920. O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

12) Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório: Projeto – Efeito do Extrato de Beterraba e Cirurgia Bariátrica, criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de sangue e saliva para fins de pesquisa, visto que essas amostras podem ser utilizadas para outros projetos de pesquisa que visem mostrar de forma mais detalhada o efeito do extrato de beterraba no sistema cardiovascular. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue e saliva para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a pesquisa, um dia antes de você começar a tomar o extrato e no último dia (como está explicado no tópico 2 desse Termo de Consentimento). Após coletado será guardado em biorrepositório localizado no Laboratório do Professor Drº. José Eduardo Tanus dos Santos que fica localizado no

segundo piso do Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no Departamento de Farmacologia, Av. Bandeirante, 3900 – Monte Alegre, CEP: 14049-900, Contato telefônico: 3315-3040, onde as amostras serão armazenadas por 10 (dez) anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue e saliva será identificada por meio de códigos.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. A senhora também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato da senhora, para que seja possível encontrá-la posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa a senhora será contatada para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada por você e pelo pesquisador responsável, será entregue a senhora.

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____,
Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados da testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Efeitos da alteração da cirurgia bariátrica nos efeitos do nitrito oral

Responsáveis:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP)

Prof. Dr.: Rafael Kemp (HC-FMRP-USP)

Prof. Dr.: Wilson Salgado Junior (HC-FMRP-USP)

Prof. Dr.: Eduardo Barbosa Coelho (HC-FMRP-USP)

Ms. Jéssica Maria Sanches Lopes - Pós-graduanda (FMRP-USP)

Leevan José Sousa Leite Pós-graduando (FMRP-USP)

A senhora está sendo convidada a participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso a senhora não aceite participar da pesquisa, não será penalizado de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

Os detalhes da pesquisa são:

1) Por que esta pesquisa está sendo feita?

As doenças do coração e vasos são bastante comuns entre os adultos. Essas doenças atacam os vasos sanguíneos. Eles são revestidos por uma camada interna que protege os vasos pela produção de uma substância chamada óxido nítrico. Para a produção desta substância nos vasos é preciso que o estômago transforme alguns elementos de nossa dieta. Quando comemos alimentos como beterraba, espinafre, alface eles possuem nitrato que é transformado em óxido nítrico, ajudando então na proteção dos vasos. Para que ocorra esta transformação, é preciso que a acidez do estômago esteja funcionando bem. Em pacientes que fizeram a cirurgia bariátrica, ou seja, tiveram o estômago diminuído, a acidez do estômago está diminuída e assim esses pacientes podem perder essa proteção vinda dos alimentos que comemos. Nós não sabemos se isso realmente acontece, por esse motivo estamos convidando você a participar desta pesquisa para analisarmos se realmente os pacientes que fizeram a cirurgia de redução do estômago tem uma diminuição da proteção dos vasos vinda da alimentação. Assim, nesse trabalho vamos estudar dois grupos de pessoas. Pessoas que fizeram a cirurgia de redução do estômago e comparar com pessoas que não passaram pela cirurgia. É importante estudar pessoas que não passaram pela cirurgia, porque podemos comparar com o que acontece com as pessoas que fizeram a cirurgia. **Você fará parte do grupo que passou pela cirurgia de redução do estômago.**

2) Sua participação neste estudo será:

Se você concordar em participar da pesquisa, você irá passar por uma consulta inicial onde será realizada uma avaliação médica geral, a medida da pressão arterial e análise de parâmetros laboratoriais de rotina. Você será informado para evitar comer vegetais ou alimentos ricos em nitratos e não utilizar enxaguante bucal durante o período do experimento. No dia combinado você terá que fazer 12h de jejum e às 7h ir a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP), e iremos coletar 30 mL de sangue da veia do seu braço (cerca de 2 colheres de sopa) para dosar as substâncias que mostram como

está a saúde dos seus vasos sanguíneos e coletaremos sua saliva (cerca de 1 colher de sopa). Faremos ainda dois testes com você. Um será o endopat, exame que mede a capacidade dos vasos se dilatarem. Este exame é simples e usa um sensor semelhante a um prendedor de roupas que fica na ponta do dedo indicador e um manguito parecido com o de um aparelho de medir pressão. Nós vamos inflar o manguito por 5 minutos no seu braço e medir a vermelhidão que acontece quando o manguito é desinsuflado. Este exame causa um desconforto pelo aperto do braço, mas é inofensivo para você. O outro será o VOP que vai ver a velocidade da onda de pulso (VOP), ou seja, a saúde da sua artéria, para isso você estará deitado e será colocada uma borrachinha sensível a sua pressão no seu pescoço e na sua perna. Este exame não causa nenhum desconforto. Também vamos começar um exame de monitorização da pressão arterial por 24h (MAPA). Neste exame, você terá as medidas de pressão feitas de forma automática a cada 15 minutos durante o dia e 30 minutos durante a noite. Neste dia você não poderá tomar banho e o aparelho pode trazer desconforto durante as medidas.

Na manhã seguinte após colocar o MAPA, você vai voltar a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para devolver o equipamento de MAPA e você vai tomar, pela primeira vez, o extrato de beterraba que iremos te dar em saquinhos que devem ser dissolvidos em água. Nesse dia, vamos te ensinar como dissolver e tomar de forma correta e você ficará em observação por 4 horas para termos certeza que você ficará bem. Você tomará por 14 dias no período da manhã o extrato de beterraba que iremos te dar em saquinhos que devem ser dissolvidos em água da mesma forma que você fez no primeiro dia. No 14º dia você terá que realizar 12h de jejum e às 7h voltar novamente na Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para tomar o último saquinho de extrato de beterraba e repetirmos os dois testes. Vamos retirar mais 30 mL de sangue e coletar sua saliva, e será colocado o MAPA, tudo como no primeiro dia. No dia seguinte pela manhã, você voltará a Unidade de Pesquisa Clínica do (HCFMRP / SP) para devolver o aparelho MAPA e nesse dia sua participação no estudo terminará.

Com a medida da sua pressão, o seu sangue, sua saliva e os 2 testes pretendemos estudar como a alimentação com a beterraba pode modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo e presentes no seu sangue. Isto nos ajudará no entendimento das mudanças que acontecem depois da tomar o extrato de beterraba.

Seu sangue e saliva ficarão guardados no Departamento de Farmacologia para possível repetição de análise.

3) Pode haver pequenos riscos e desconfortos relacionados à coleta do sangue, ainda que raros e passageiros, como dor no local da coleta, hematoma e tontura. Pode haver pequenos riscos de redução da pressão arterial e tontura ao tomar o extrato de beterraba. A coleta de sangue será realizada por um enfermeiro treinado, o que diminui os riscos relacionados à coleta. Se houver algum tipo desses problemas, os profissionais responsáveis pela coleta são habilitados a resolvê-los. Este volume de sangue coletado é cerca de 2,5 vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todo o estudo laboratorial mencionado acima.

4) **NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA ESTUDO.** Indiretamente, acreditamos

que este estudo trará como benefício um entendimento das alterações hemodinâmicas decorrentes da ingestão do extrato de beterraba.

5) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso ocorram gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntária desta pesquisa, como por exemplo, gastos com transporte no valor de 30,00 a cada visita.

6) A paciente que venha participar dessa pesquisa em nível de pós-graduação, tem direito a indenização caso haja algum dano decorrente da pesquisa de acordo com as leis vigentes no país.

7) Você possui o tempo que for necessário para a tomada de uma decisão autônoma se quer participar do estudo e tem liberdade de recusar em participar da pesquisa.

8) É garantido o seu sigilo e privacidade. Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade das voluntárias nela envolvidos.

9) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

10) A qualquer momento durante o estudo e a senhora tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

11) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o procedimento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou a Pós-graduanda Jéssica Maria Sanches Lopes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). As voluntárias podem tirar qualquer dúvidas com o Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos e a aluna Jéssica Maria Sanches Lopes, no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Avenida Bandeirantes, 3900 – Bairro Monte Alegre – Ribeirão Preto-SP no período entre 8h às 17h. Telefone para contato nesse período é (16) 3315-3163 ou (16) 3315-3040. Se houver urgência, telefone 24h / 7 dias: (16) 99797-3920. O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

12) Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório: Projeto – Efeito do Extrato de Beterraba e Cirurgia Bariátrica, criado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de sangue e saliva para fins de pesquisa, visto que essas amostras podem ser utilizadas para outros projetos de pesquisa que visem mostrar de forma mais detalhada o efeito do extrato de beterraba no sistema cardiovascular. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue e saliva para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante a pesquisa, um dia antes de você começar a tomar o extrato e no último dia (como está explicado no tópico 2 desse Termo de Consentimento). Após coletado será guardado em biorrepositório localizado no Laboratório do Professor Drº. José Eduardo Tanus dos Santos que fica localizado no

segundo piso do Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no Departamento de Farmacologia, Av. Bandeirante, 3900 – Monte Alegre, CEP: 14049-900, Contato telefônico: 3315-3040, onde as amostras serão armazenadas por 10 (dez) anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de sangue e saliva será identificada por meio de códigos.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. A senhora também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato da senhora, para que seja possível encontrá-la posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado.

Declaramos para os devidos fins que a cada nova pesquisa a senhora será contatada para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada por você e pelo pesquisador responsável, será entregue a senhora.

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____,
Bairro _____, cidade _____, telefone _____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados da testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____