



EFEITO TÉRMICO DA SUPLEMENTAÇÃO DE SUCO DE BETERRABA EM CAMUNDONGOS C57BL/6J SUBMETIDOS CRONICAMENTE AO AMBIENTE DE HIPÓXIA NORMOBÁRICA

Palavras-Chave: suco de beterraba; óxido nítrico; hipóxia; anapirexia; termografia.

Autores(as):

GIOVANNA OEHLMEYER ARNOSTI, FCA– UNICAMP

Richard Danilo Serrano, FCA - UNICAMP

Matheus Rodrigues Santos- FCA - UNICAMP

Beatriz de Oliveira, FCA - UNICAMP

Letícia De Nicolai, FCA - UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Papoti, EEFERP – USP

Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado-Gobatto, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO (orientador), FCA- UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Por ser acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, o oxigênio (O_2) é fundamental para a sobrevivência dos organismos aeróbios. Portanto, trata-se de um elemento essencial na síntese de ATP e manutenção do metabolismo celular (Branco et al., 2005). Sendo assim, qualquer fator que dificulte o acesso ao O_2 , ameaça a homeostase corporal (Steiner et al., 2002). Dentre esses fatores, destaca-se a hipóxia ambiental, causada pela exposição a elevadas altitudes (Malkov et al., 2021). Tal fato ocorre em razão da mudança de ambiente, quando habitantes que residem no nível do mar se deslocam para elevadas altitudes, ficando sujeitos a diminuição da pressão atmosférica e diminuição da oferta de O_2 (Brent et al., 2022).

O organismo emprega uma série de ajustes compensatórios para proteger-se do estresse provocado pela hipóxia. A principal mediadora dessas respostas adaptativas é o fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1), que, durante essa condição ambiental, forma-se através da união de suas duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β . A molécula HIF-1, por sua vez, reconhece a hipóxia por meio dos mecanismos responsivos à hipóxia (HRE) (Lundby et al., 2009). Dentre esses ajustes, muitos apresentam evidências robustas, principalmente em contexto de hipóxia hipobárica, como é o caso da hiperventilação, aumento do débito cardíaco, elevação da atividade simpática e concentração de hemoglobinas (Dünnwald et al., 2019; Stellingwerff et al., 2019). Entretanto, há respostas de grande importância para o organismo que ainda não foram tão bem elucidadas, entre elas a anapirexia (Steiner, 2002).

Anapirexia é o nome dado aos ajustes de diminuição da temperatura corporal, em resposta à hipóxia (Steiner et al., 2000). Essa resposta compensatória ocorre para limitar a hiperventilação causada pela hipóxia, devido à baixa disponibilidade de oxigênio. Fato é que a anapirexia atua como um mecanismo de proteção, pois reduz a taxa metabólica quando a oferta de O_2 é limitada, conservando energia (Scariot et al., 2023).

A suplementação de suco de beterraba (BR) vem sendo muito estudada como aliada em condições de hipóxia, como a altitude e o exercício físico (Hoon, 2014). Considerando que BR possui uma alta concentração de NO_3^- (nitrito) (Karwowska, Kanoniuk, 2020; Wruss et al., 2014), que por sua vez aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) por meio da via NO_3^- - nitrito (NO_2^-) - NO. Esse produto final da via é capaz de promover vasodilatação nas fibras musculares, aumentando o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, elevando a oferta de O_2 aos tecidos (Montfort et al., 2017; Castro et al., 2019). Dessa forma, os locais hipóxicos na musculatura são reduzidos. Por outro lado, o auxílio ergogênico de BR na melhora da circulação sanguínea vem sendo estudado como efeito promissor para atletas (Wylie et al. 2013; Hoon et al., 2013). Nesse caso, um de seus potenciais benefícios está associado à eficácia do reaquecimento periférico corporal. O estudo de Wakabayashi e colaboradores (2022)

mostrou que a ingestão de BR antes da imersão das mãos em água a 8°C foi capaz de resultar em um aquecimento consideravelmente mais rápido da pele dos dedos, após a retirada dos membros da água fria. Em situações hipóxicas esse aumento da temperatura corporal pode ser comprometedor ao organismo, dado que tem potencial para atenuar ou até mesmo prejudicar a anapirexia, mecanismo de defesa do organismo. Sendo assim, existe a possibilidade da suplementação de BR não ser completamente benéfica no contexto hipóxico. Na atualidade, por meio de medidas termográficas obtidas de diferentes regiões corporais, é possível investigar o efeito da suplementação de BR em modelo experimental de camundongos, submetidos ao ambiente hipóxico normobárico, suprimindo assim essa lacuna. Desse modo, o presente estudo objetivou analisar os efeitos da administração do suco de beterraba sobre as respostas térmicas de camundongos (temperatura da cabeça, cauda e corpo inteiro), habitando em condições de normóxia ou hipóxia normobárica por quatro semanas.

METODOLOGIA:

PROTOCOLO COM OS ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos machos adultos (C57BL/6J), com massa corporal inicial de aproximadamente 30g. Os camundongos foram alojados de forma coletiva (10 animais por gaiola) (Polisel et al., 2021; Scariot et al., 2023) e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa – CEUA (protocolo 6526-1/2024)

DESIGN DO ESTUDO

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em duas condições ambientais: normóxia (NOR, n=20) e hipóxia (HYP, n=20) e subdivididos em 2 grupos (n=10 por grupo) dentro de cada classe de alojamento. Os animais mantidos em normóxia foram divididos em normóxia controle (NOR-C) e normóxia BR (NOR-BR), o que ocorreu de maneira similar para os camundongos mantidos em hipóxia, subdivididos em hipóxia controle (HYP-C) e hipóxia BR (HYP-R).

CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Os animais da condição ambiental hipóxia foram alocados em uma tenda hipóxica normobárica (Colorado Altitude Training, Louisville, Colorado, EUA) à uma FiO₂ de 14,5% (altitude de ~3.000 metros) 24 horas por dia. Por outro lado, os animais condicionados à normóxia ficaram expostos à uma FiO₂ de 20,8% (altitude de ~588 metros). Todas as manipulações realizadas em ambos os grupos ocorreram em ambiente normóxico.

SUPLEMENTAÇÃO COM SUCO DE BETERRABA

Anteriormente ao início da suplementação, os todos animais foram adaptados ao procedimento de gavagem para minimizar o estresse. Os camundongos foram suplementados diariamente, com BR rico em NO₃⁻ (Beet it, James White Drinks, Ipswich, Reino Unido) ou salina, dependendo do grupo. Os NOR-BR e HYP-BR receberam BR na dose de 1mmol/kg/dia de NO₃⁻. Os grupos NOR-C e HYP-C fizeram ingestão de salina, de modo a simular o estresse sofrido pelos grupos BR (Ferguson et al., 2013; Tropea et al., 2020; Ferguson et al., 2020). Todos os roedores foram tratados por gavagem, durante 4 semanas (Krajka-Kuzniak et al., 2012; Szaefer et al., 2014; Surono et al., 2020), suplementados diariamente, em mesmo horário (entre as 14:00 e 16:00 horas). Os animais foram adaptados ao procedimento de gavagem para minimizar o estresse.

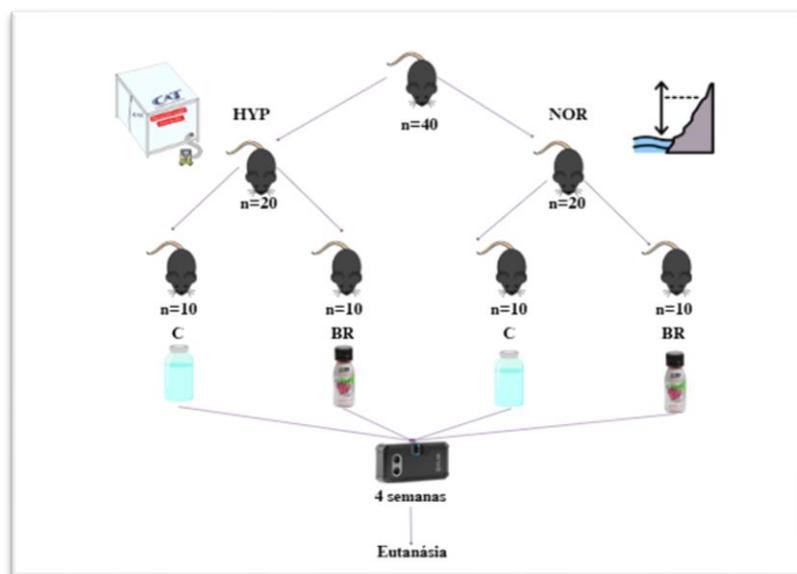


Figura 1: Design do estudo representado pelos grupos submetidos a ambientação em hipóxia (HYP) ou normóxia (NOR) e ao tratamento com suco de beterraba (BR) ou solução salina/ controle (C).

REGISTROS TERMOGRÁFICOS

Os registros de temperatura foram executados por meio de uma câmera infravermelha (FLiR ONE Pro, FLiR Systems Inc., Wilsolville, OR) e realizados em uma sala climatizada com temperatura e umidade constantes, após um período de aclimação às condições do ambiente. A câmera foi posicionada verticalmente, efetuando registros perpendiculares a região de interesse. A distância entre a câmera e o animal foi de 25cm para manter as condições operacionais padrões. As imagens foram capturadas semanalmente, pré e pós administração do suco de beterraba (ou salina), correspondendo ao período pré e pós ciclo escuro, com exceção à primeira semana, que foram feitos quatro registros (início e final da primeira semana). As imagens geradas foram analisadas por meio do software FLiR Thermal Studio (versão 1.8.2), sendo selecionadas as regiões de interesse (cabeça, dorso e cauda) dos camundongos por meio das formas analíticas disponibilizadas pelo programa (círculo, elipse, linha, ponto) (Scariot et al., 2023; Araujo et al., 2024). Para o presente estudo, estão sendo apresentados os resultados do início do experimento (base line) e após 4 semanas de intervenção, com a suplementação de BR e condições ambientais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para esse estudo, estão sendo apresentados os resultados obtidos no início do experimento (baseline) e após 4 semanas de intervenção com a suplementação de BR e condições ambientais (hipóxia normobárica). Todos os dados foram tabulados em planilhas Excel, tratados por meio do software R Studio 2025.05.1 e apresentados graficamente (software GraphPad Prism 8.0.1), descritos como média \pm desvio padrão. Inicialmente, foram aplicados os testes Shapiro-Wilk e Levene para investigar a normalidade e homogeneidade dos dados. Considerando o perfil não normal detectado, o estudo foi conduzido com análises não paramétricas. Assim, a comparação intragrupo, antes e após a intervenção, foi realizada por Wilcoxon. Com finalidade de determinar os efeitos do ambiente e ingestão do suco de beterraba sobre temperaturas das regiões cabeça, dorso e cauda, foi aplicado o teste de Scheirer-Ray-Hare, com post-hoc Dunn. O teste de Spearman investigou possíveis correlações entre as temperaturas pré e pós experimento intragrupo, considerando as mesmas regiões analisadas. Em todas as condições, o nível de significância foi fixado em $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A estatística adotada não revelou efeito da intervenção com suplementação de BR ($p=0,440$), mas sim do ambiente hipóxico ($p=0,025$), com interação entre esses efeitos ($p=0,012$). A figura 2, painel A, apresenta os resultados de temperatura corporal na região da cabeça, nos momentos pré e pós intervenção ambiental e com suco de beterraba, para os grupos NOR-C, NOR-BR, HYP-C e HYP-BR. Em análise intragrupo, apenas foi observada diferença entre os momentos baseline e após 4 semanas nos camundongos que não sofreram intervenções nutricionais ou ambientais (NOR-C, $p=0,011$), com valores mais elevados ao final do experimento, mas sem correlação significativa entre os dados ($r = -0,42$, $P > 0,05$). Ademais, não foram identificadas diferenças de temperatura nessa região entre os grupos. A única correlação significativa observada entre a temperatura da cabeça pré e pós intervenções foi identificada no grupo NOR-BR ($r=0,794$, $P < 0,05$).

Na figura 2, painel B, estão apresentados os resultados de temperatura do dorso dos camundongos pertencentes aos quatro grupos analíticos, antes e após 4 semanas. Nessa região, a habitação em hipóxia sem a ingestão do BR, reduziu a temperatura em aproximadamente 1°C (HYP-C antes= $30,9 \pm 0,8$ e após= $29,8 \pm 1,2^\circ\text{C}$, $p=0,027$). No momento pós intervenção, o grupo NOR-BR apresentou menor temperatura do dorso em comparação NOR-C ($p=0,034$) e ao HYP-BR ($p=0,013$). Já no HYP-BR, temperatura mais elevada dessa região foi encontrada ($31,5 \pm 0,4^\circ\text{C}$), sendo essa maior que os grupos NOR-BR e HYP-C.

No que se refere à temperatura média da cauda dos animais (Figura 2, painel C), apenas no grupo HYP-C houve redução significativa em comparação ao momento pré-intervenção ($26,5 \pm 1,5$ e $25,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$, respectivamente, com $p=0,004$). Após as intervenções nutricional e ambiental, o grupo NOR-BR apresentou menores valores de temperatura caudal em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$ em todos os casos).

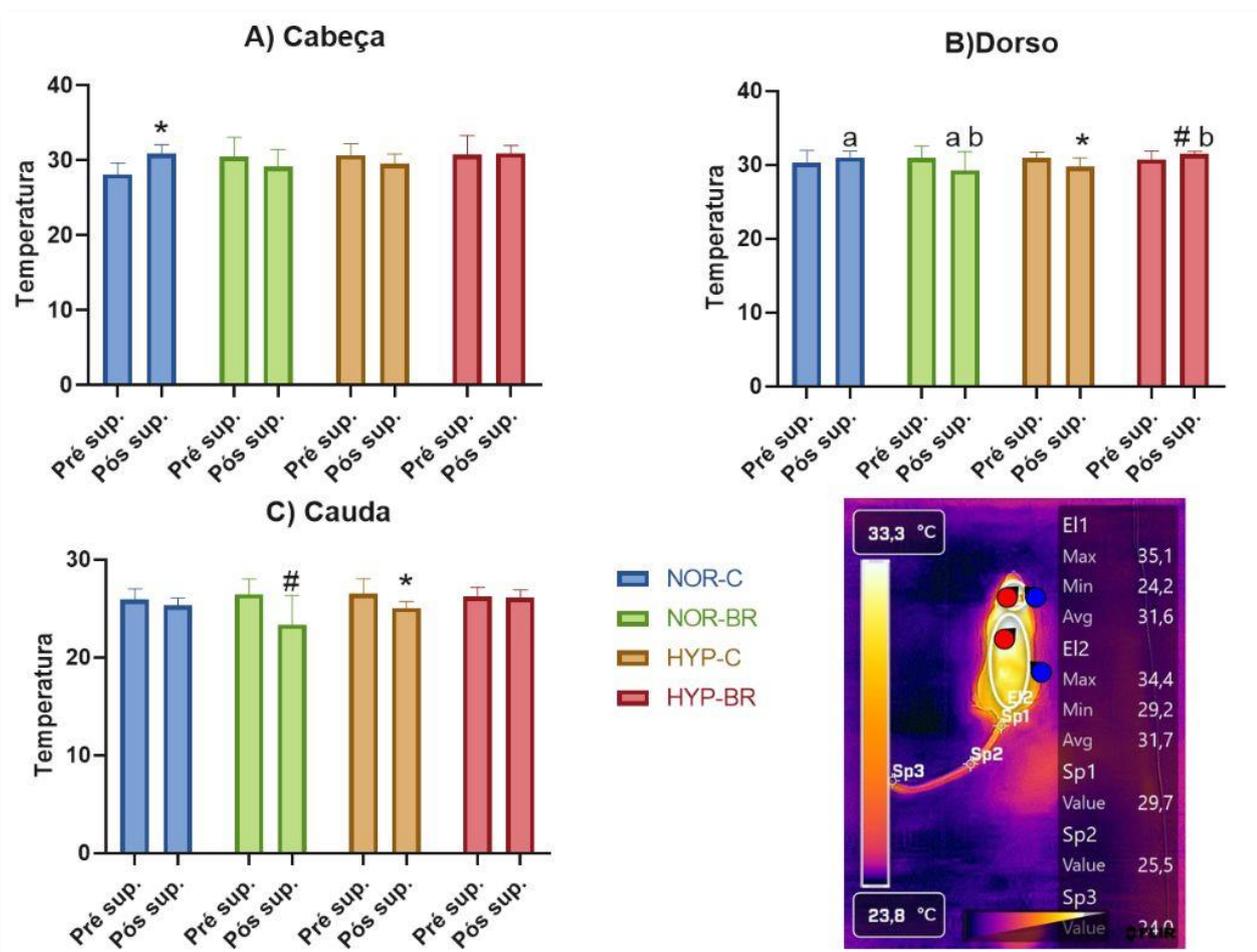


Figura 2: Resultados apresentados pelos diferentes grupos experimentais, em momentos pré e pós intervenções nutricional (suco de beterraba – BR) e ambiental (hipóxia – HYP), por quatro semanas. As temperaturas médias e desvio padrão para as temperaturas da região da cabeça (Painel A), dorso (Painel B) e cauda (Painel C) foram identificadas de acordo com as marcações exemplificadas na imagem termográfica. *representa diferença pré e pós intervenção, intragrupo; # representa diferença entre os demais grupos no momento pós intervenção; a representa diferença entre os grupos normóxia controle (NOR-C) e normóxia beterraba (NOR-BR) ; b representa diferença entre normóxia beterraba (NOR-BR) e hipóxia beterraba (HYP-BR). $P \leq 0,05$

CONCLUSÕES:

Os resultados do presente estudo sugerem que tanto a habitação em ambiente de hipóxia normobárica, como a suplementação do suco de beterraba promoveram ações distintas na temperatura de diferentes regiões corporais dos camundongos C576L/BJ. O mecanismo de anapirexia foi expresso nos resultados nas regiões do corpo e cauda, o que ressalta a sua validade e importância em contexto hipóxico. Quanto ao suco de beterraba, a suplementação com esse composto atuou de maneira região dependente sobre a temperatura corporal, com variações em seus efeitos nas diferentes regiões e exposições ambientais, o que gera dúvida sobre sua capacidade de atenuar a anapirexia. Assim, mais estudos são necessários para que os resultados sejam mais consistentes e esclareçam, de fato, os mecanismos associados com a variação da temperatura de camundongos submetidos a hipóxia e a ingestão de suco de beterraba.

AGRADECIMENTOS: Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPESP (proc.2023/02728-3).

BIBLIOGRAFIA

Soares de Araujo, L., Marostegan, A.B., Menezes Scariot, P.P. et al. "Inspiratory muscles pre-activation in young swimmers submitted to a tethered swimming test: effects on mechanical, physiological, and skin temperature parameters". *Sci Rep* 14, 5975 (2024).

Branco, Luiz G.S., et al. "Anapnoea during hypoxia". *Journal of Thermal Biology* 31 (2006): 82-89

Brent, Mikkel Bo. "A review of the skeletal effects of exposure to high altitude and potential mechanisms for hypobaric hypoxia-induced bone loss." *Bone* 154 (2022): 116258.

Castro, Talitha F., et al. "Effects of chronic beetroot juice supplementation on maximum oxygen uptake, velocity associated with maximum oxygen uptake, and peak velocity in recreational runners: a double-blinded, randomized and crossover study." *European Journal of Applied Physiology* 119.5 (2019): 1043-1053.

Dünnwald, Tobias, et al. "Body composition and body weight changes at different altitude levels: a systematic review and meta-analysis." *Frontiers in physiology* 10 (2019): 430.

Ferguson, Scott K., et al. "Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats." *The Journal of physiology* 591.2 (2013): 547-557.

Ferguson, Scott K., et al. "The effect of dietary nitrate supplementation on the speed-duration relationship in mice with sickle cell disease." *Journal of Applied Physiology* 129.3 (2020): 474-482.

Hoon, Jones, M. W., et al. "The Effect of Variable Doses of Inorganic Nitrate-Rich Beetroot Juice on Simulated 2000-m Rowing Performance in Trained Athletes". *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 9(4),(2014):615-620.

Karwowska, Małgorzata, and Anna Kononiuk. "Nitrates/nitrites in food—Risk for nitrosative stress and benefits." *Antioxidants* 9.3 (2020): 241.

Krajka-Kuźniak, Violetta, et al. "Beetroot juice protects against N-nitrosodiethylamine-induced liver injury in rats." *Food and chemical toxicology* 50.6 (2012): 2027-2033.

Lundby, Carsten, Jose AL Calbet, and Paul Robach. "The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia." *Cellular and molecular life sciences* 66 (2009): 3615-3623.

Malkov, Mykyta I., Chee Teik Lee, and Cormac T. Taylor. "Regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) by pro-inflammatory cytokines." *Cells* 10.9 (2021): 2340.

Montfort, William R., Jessica A. Wales, and Andrzej Weichsel. "Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor." *Antioxidants & redox signaling* 26.3 (2017): 107-121.

Polisel, Emanuel EC, et al. "Effects of high-intensity interval training in more or less active mice on biomechanical, biophysical and biochemical bone parameters." *Scientific Reports* 11.1 (2021): 6414.

Scariot, Pedro Paulo Menezes, et al. "Living high-training low model applied to C57BL/6J mice: Effects on physiological parameters related to aerobic fitness and acid-base balance." *Life Sciences* 317 (2023): 121443.

Steiner, Alexandre A., et al. "Role of neuronal nitric oxide synthase in hypoxia-induced anapnoea in rats" *Journal of applied physiology* 01.09 (2000)

Steiner, Alexandre A., et al. "A neurochemical mechanism for hypoxia-induced anapnoea". *American journal of physiology* 283 (2002): R1412-R1422

Stellingwerff, Trent, et al. "Nutrition and altitude: strategies to enhance adaptation, improve performance and maintain health: a narrative review." *Sports Medicine* 49 (2019): 169-184.

Surono, Ingrid S., et al. "Effect of functional food ingredients on gut microbiota in a rodent diabetes model." *Nutrition & Metabolism* 17 (2020): 1-9.

Szaefer, Hanna, et al. "Evaluation of the effect of beetroot juice on DMBA-induced damage in liver and mammary gland of female sprague-dawley rats." *Phytotherapy Research* 28.1 (2014): 55-61.

Wakabayashi, Hitoshi, et al. "Influence of acute beetroot juice supplementation on cold-induced vasodilation and fingertip rewarming" *European Journal of Applied Physiology* 123 (2022): 495-507

Wylie, L.J., Mohr, M., Krstrup, P. et al. "Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance". *European Journal of Applied Physiology* 113(2013): 1673–1684 .