

SUPLEMENTAÇÃO DE NITRATO E SUA RELAÇÃO COM A FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E EXERCÍCIO FÍSICO

Thaysa Ghiarone^{1,2*};
Thays de Ataíde e Silva²;
Rômulo Bertuzzi³;
Adriano Eduardo Lima-Silva².

RESUMO

A ingestão de nitrato vem crescendo em popularidade no meio esportivo. Esta revisão objetiva esclarecer os mecanismos responsáveis pelo efeito da suplementação de nitrato relacionadas ao óxido nítrico, bem como descrever os efeitos agudos e crônicos da suplementação com nitrato sobre o desempenho. O óxido nítrico é um radical livre endógeno de meia vida curta e contribui de forma significativa na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, mensageiro intercelular, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da agregação plaquetária, pressão arterial, fluxo sanguíneo e respiração mitocondrial. A suplementação com nitrato aumenta a disponibilidade de óxido nítrico no organismo, este por sua vez age sobre a mitocôndria promovendo efeitos importantes no consumo de oxigênio durante o exercício. Tem sido demonstrado que a suplementação dietética com nitrato acarreta aumento no tempo de exaustão durante exercícios de alta intensidade, melhora no desempenho em exercícios contra relógio e promove redução significativa no consumo de oxigênio pulmonar em intensidades submáximas. Por outro lado, apesar de haver tendência ao uso de suco de beterraba, não existe consenso em relação à forma de administração de nitrato, tampouco conformidade quanto a melhor dose resposta.

Palavras-chave: beterraba, nitrito e desempenho.

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Alagoas.

²Grupo de Pesquisa em Ciência do Esporte, Departamento de Educação física e Ciência do Esporte (CAV), Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco. CEP 55608-680, Brasil.

ABSTRACT

The intake of nitrate has been growing in popularity in sports. This review aims to clarify the mechanisms responsible for the effect of nitrate supplementation related to nitric oxide, and to describe the acute and chronic effects of nitrate supplementation on performance. Nitric oxide is an endogenous free radical short half-life and significantly contributes in regulating many body functions such as muscle contractility, energy metabolism, intercellular messenger, macrophage-mediated cytotoxicity, inhibition of platelet aggregation, blood pressure, blood flow and mitochondrial respiration. Nitrate supplementation increases the availability of nitric oxide in the body which acts on the mitochondria promoting important effects on oxygen uptake during exercise. It has been shown that nitrate supplementation causes an increase in time to exhaustion during high-intensity exercise, improving performance in time trials and promotes significant reduction in pulmonary oxygen uptake at submaximal intensities. Moreover, although there was a trend to the use of beet juice, there is no consensus on the mode of administration of nitrate, nor compliance as the best dose response.

Key-words: beetroot, nitrite and performance

INTRODUÇÃO

Sabe-se que o óxido nítrico (NO), denominado inicialmente como um fator de relaxamento derivado do endotélio¹, não necessita de receptor específico para agir sobre uma determinada célula. Sua atividade depende de sua concentração, reatividade química, proximidade das células alvo e a forma como as células alvo são programadas para responder². Dessa forma, ele age como uma molécula sinalizadora na regulação de muitas funções corporais tais como: contratilidade muscular, metabolismo energético, respiração mitocondrial, inibição da agregação plaquetária, pressão e fluxo sanguíneo³.

De acordo com os efeitos supracitados, sugere-se que o NO seja capaz de interferir nas respostas fisiológicas durante o exercício, direta ou indiretamente, promovendo alterações importantes responsáveis pela melhora do desempenho esportivo. Acredita-se que os seus níveis nos tecidos são regulados pelo balanço entre a produção e o consumo, de maneira que atualmente existem evidências de duas vias de produção endógena de NO no organismo humano, sendo elas: 1) a via principal, onde o NO é produto da oxidação da L-arginina, numa reação catalisada pela classe de enzimas óxido nítrico sintases (NOS); 2) a via alternativa, em que parte do nitrato ingerido é absorvido na circulação, o qual é posteriormente secretado na saliva pelas glândulas salivares e reduzido a nitrito (NO_2^-) na cavidade oral. Esse nitrito salivar é deglutido e posteriormente convertido a NO por uma variedade de enzimas no sangue e tecidos. O NO produzido a partir da suplementação de nitrato age sobre a mitocôndria promovendo efeitos importantes no consumo de oxigênio durante o exercício físico. Tem sido demonstrado que a suplementação dietética com nitrato acarreta aumento no tempo de exaustão durante exercícios de alta intensidade, melhora no desempenho em exercícios contra relógio e produz uma redução significativa no consumo de oxigênio pulmonar em intensidades submáximas.

Assim, este trabalho tem por objetivo revisar as principais vias de obtenção do NO, seus efeitos fisiológicos e o uso da suplementação de nitrato, enquanto precursor do NO, sobre o desempenho esportivo nas diferentes modalidades e protocolos de exercício. Contudo, para subsidiar a explicação dos principais mecanismos que

explicam uma possível melhora do desempenho após a suplementação de nitrato, uma breve revisão sobre as vias de obtenção do NO será apresentada.

DESENVOLVIMENTO

VIAS DE OBTENÇÃO DO NO

Como supracitado, os níveis de NO nos tecidos são regulados por duas vias de produção endógena: a via principal, a partir da L-arginina, e a via alternativa que utiliza nitrato como precursor.

1) A partir da L-Arginina:

O NO é produto da oxidação da L-arginina, numa reação catalisada pela classe de enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Essa reação é dividida em dois estágios, onde no primeiro há conversão de L-arginina em N-Hidroxi-L-arginina e no segundo há formação de L-Citrulina e NO. Ambas as reações são de oxidação e necessitam de O₂ e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) para captar os elétrons, sendo dois elétrons na primeira reação e três NAPH na segunda (Fig. 1).

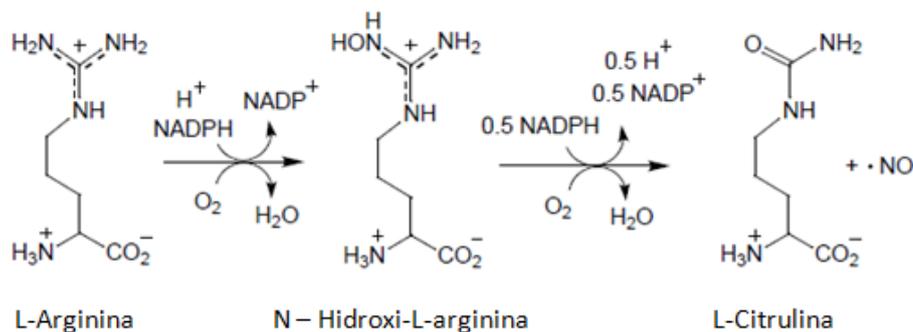


Figura 1. Reações de formação de NOS a partir da L-Arginina.

Em todo o corpo, diferentes tipos de células são capazes de sintetizar o NO por meio de hemoproteínas da família citocromo P450, as NOS⁴. Atualmente foram identificadas três isoformas de NOS, todas utilizando L-arginina como substrato e O₂ como co-substrato, sendo duas constitutivas e uma induzível: 1) tipo I, NOS neuronal (nNOS); 2) tipo II, NOS induzível (iNOS) e; 3) Tipo III, NOS endotelial (eNOS). Os tipos nNOS e eNOS são enzimas constitutivas normalmente presentes na célula e são controladas por Ca²⁺/calmodulina intracelular, enquanto a iNOS é independente de Ca²⁺ e está presente em muitas células envolvidas na imunidade e inflamação, além

de produzir altos níveis de NO quando ativadas, em comparação com as isoformas constitutivas.

As NOS produzem NO e L-citrulina por catalisar a oxidação de cinco elétrons da L-arginina numa série de reações na presença de O₂ e NADPH, tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como cofatores⁴⁻⁶. A L-citrulina por sua vez pode ser reciclada em arginina por meio da ação combinada da arginino succinato sintase (ASS) e arginino succinato liase (ASL) em quase todos os tipos de células e em diferentes graus (Figura 2). Portanto, arginina e citrulina auxiliam a síntese de NO em uma variedade de tecidos^{7, 8}.

A nNOS, presente principalmente em células neuronais, regula a transmissão sináptica no SNC e atua na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos⁹. Já a produção de NO pelo eNOS é essencial para a manutenção da homeostase do sistema cardiovascular e tônus vasodilatador basal¹⁰⁻¹² e sua expressão aumenta com o exercício regular¹³. Este NO por sua vez inibe a agregação de plaquetas, aderência de leucócitos às células endoteliais, proliferação do músculo liso, modula a respiração, e exerce efeito antioxidante e atividade anti-inflamatória¹⁴⁻¹⁷.

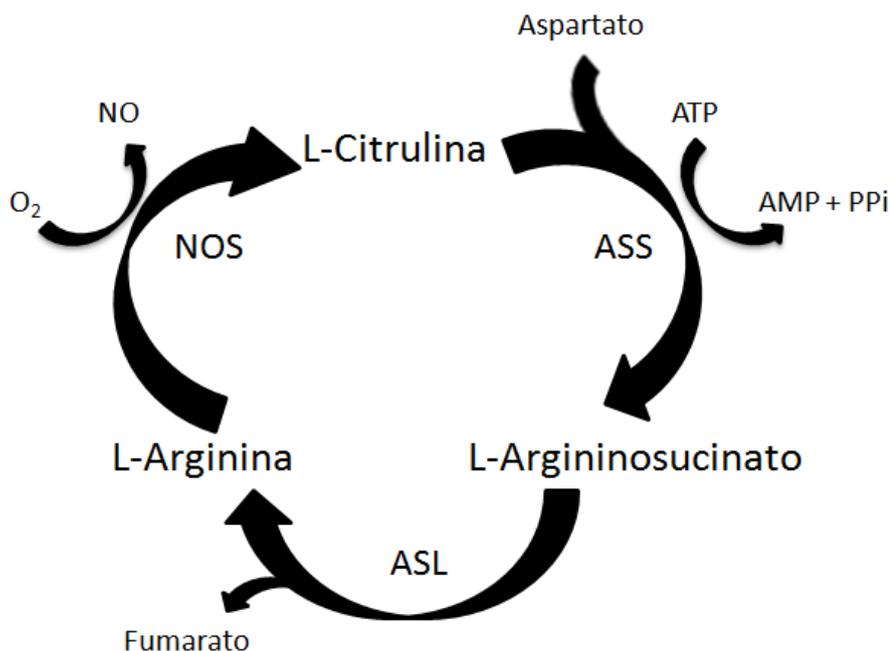


Figura 2. Reciclagem da L-Arginina. NOS: Óxido nítrico sintase; ASS: Arginino succinato sintase e ASL arginino succinato liase.

2) A partir do nitrato:

A via alternativa para obtenção de NO utiliza parte do nitrato (NO_3^-), em particular do exógeno, que após a ingestão é completamente absorvido para a corrente sanguínea pelo trato gastrointestinal superior, onde se mistura com nitrato sintetizado endogenamente. Cerca de 25% do nitrato presente no plasma é secretado na saliva pelas glândulas salivares. Após a ingestão, o nitrato salivar atinge concentração de 10-20 vezes maior que seus níveis plasmáticos basais. O pico de concentração de NO_3^- é atingido por volta de 60min após sua ingestão, e sua meia-vida no plasma é de 5-6 h¹⁸⁻²⁰. Em seguida, esse nitrato é reduzido a nitrito (NO_2^-) por bactérias anaeróbias facultativas presentes na cavidade oral que utilizam nitrato como acceptor final de elétrons para gerar ATP em condições de baixa oxigenação²¹. Esta redução é muito eficaz e aproximadamente 100% do nitrato é convertido em nitrito. Por sua vez, o pico de nitrito é atingido por volta de 150 minutos após ingestão do nitrato. Esse nitrito salivar é deglutido e posteriormente convertido a NO por uma variedade de enzimas no sangue e tecidos. Estas incluem desoxihemoglobina presente no sangue, neuroglobina, xantina-oxidorreductase, aldeído-oxidase e NOS também nas proteínas tissulares³. Por último, os componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias também são capazes de converter nitrito em NO, atuando como carreadores de elétrons quando o nitrito é reduzido²²⁻²⁴.

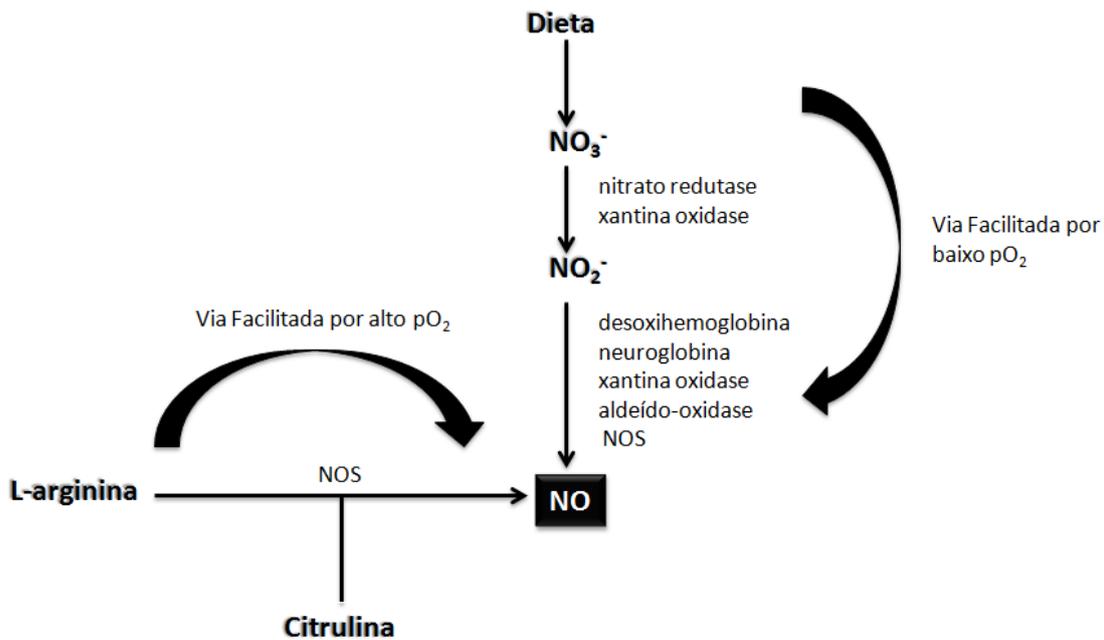


Figura 3: Vias de obtenção do NO, destacando a via do nitrato ingerido. NOS: Óxido nítrico sintetase; NO₃⁻: Nitrato; NO₂⁻: Nitrito; pO₂: Pressão parcial de oxigênio.

A relevância da via alternativa de obtenção do NO consiste no fato de que enzimas eNOS e nNOS expressas no músculo esquelético, apresentarem a Km para O₂ de 2.3 e 202 Torr, respectivamente²⁵. Durante o exercício, o músculo esquelético consome rapidamente o O₂ de forma que a pressão parcial de oxigênio (pO₂) pode atingir 2-5 Torr. Nessas condições a atividade da eNOS é em parte preservada, enquanto a atividade de nNOS pode ser reduzida, fato que limita potencialmente o fornecimento de NO por essa via. A via nitrato-nitrito-NO apresenta um menor número de etapas de limitação comparada à via principal, sendo potencializada em condições de níveis de oxigênio diminuído na microcirculação, de tal modo que é preferível para a produção de NO durante exercício²⁶.

EFEITOS FISIOLÓGICOS DO NO

O NO medeia vários fenômenos como: vasorrelaxamento dependente do endotélio, regulação da pressão sanguínea basal²⁷; inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária²⁸; defesa contra organismos infecciosos; atividade funcional, crescimento e morte de muitas células imunológica²⁹; inibição da respiração

mitocondrial³⁰⁻³²; competição com citocromo c oxidase, redução no custo de ATP na produção de força muscular³³.

De acordo com os efeitos supracitados, sabe-se que o NO é capaz de interferir nas respostas fisiológicas durante o exercício, direta e indiretamente, promovendo alterações importantes responsáveis por melhorar o desempenho, como: vasodilatação, e conseqüente aumento de fluxo sanguíneo, aumento da captação da glicose pelo músculo esquelético, redução na relação ATP/força muscular, melhora na fosforilação oxidativa e diminuição do consumo de oxigênio³⁴⁻³⁷.

No sistema cardiovascular, após ser liberado pelo endotélio o NO pode se ligar ao grupo heme da guanilato ciclase solúvel (sGC) produzindo Guanosina Monofosfato Cíclico (cGMP) este por sua vez ativa a proteína quinase G dependente de cGMP (cGK). Essa via sGC/cGMP/cGK²⁷ por meio da cGK, diminui a concentração de cálcio intracelular, o que leva a um relaxamento do músculo liso vascular e aumento no fluxo sanguíneo tecidual. Em nível coronário a inibição da produção de NO eleva a resistência vascular coronariana, indicando contribuição no mecanismo de controle basal vasodilatador e fluxo sanguíneo nesta região³⁸. O NO também contribui para regulação do tônus vascular na circulação sistêmica³⁹ demonstrada pelo rápido aumento da pressão arterial e o consumo de oxigênio nos tecidos quando a produção endógena de NO está bloqueada^{40, 41}. Esse efeito vasodilatador parece ser mantido por estímulos físicos do fluxo pulsátil e força de cisalhamento nas células endoteliais vasculares³⁴.

No músculo esquelético o NO pode modular o metabolismo de carboidratos por mediar aumento na captação da glicose pela via sGC/cGMP/cGK⁴². Durante a contração do músculo esquelético em ratos a concentração de cGMP aumenta, e isso não ocorre após inibição de NOS⁴³ indicando uma relação direta com NO. Dessa forma, um aumento de NO e sGC aumenta a formação de cGMP e captação de glicose, enquanto a inibição de sGC promove a redução na captação de glicose⁴⁴.

Por outro lado, o uso de inibidor de sGC não foi efetivo em diminuir a captação de glicose durante a contração. Além disso, um inibidor de cGK também não afetou a captação de glicose durante a contração, indicando que o NO pode ativar essa captação por via independente da NO/cGMP/cGK³⁵. Possivelmente, esse

mecanismos estão relacionados com modificações pós-translacionais de proteínas através de S-nitrosilação, S-glutathionylation e nitração de tirosina.

Embora o mecanismo completo da relação entre NO e músculo esquelético não tenha sido totalmente elucidado, um número de diferentes investigadores notaram que o NO pode desempenhar um papel na modulação da função contrátil⁴⁵⁻⁴⁷. O NO reduz a atividade da Ca²⁺ ATPase em músculo cardíaco⁴⁸. Em relação ao receptor de rianodina (canal de liberação de Ca²⁺), a atuação do NO é mais complexa, realizando tanto ativação quanto inativação. Dessa forma, os seus efeitos podem estar relacionados com a concentração de NO, o potencial de membrana e o grau de ativação do canal⁴⁹. Existem também evidências que NO diminui a velocidade de desacoplamento das pontes cruzadas⁵⁰. Isso reduz o custo de ATP na produção de força muscular durante o exercício³⁶, melhorando assim a eficiência metabólica⁵¹. Além disso, o NO pode reduzir a hidrólise de ATP para mesma carga de trabalho, fato que leva a menor degradação de fosfocreatina (PCr) e menor acúmulo de ADP e Pi. Esses resultados atenuam o estímulo para fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio (VO₂)³⁶.

No que se refere à mitocôndria, o NO e seus derivados inibem a respiração³⁰. Em concentrações nanomolares, o NO inibe citocromo c oxidase reversivelmente competindo com O₂. Altas concentrações de NO levam a produção de peroxinitrito que por sua vez inibe complexo I e II. Graças a esses efeitos, Clerc et al⁵² ao avaliar a relação entre consumo de oxigênio, síntese de ATP e potencial elétrico transmembrana em mitocôndria de fígados de ratos, confirmaram que o NO induz a uma restrição cinética do citocromo c oxidase maior que a diminuição da síntese de ATP, resultando em aumento da eficiência da fosforilação oxidativa.

Ainda, o NO pode melhorar a eficiência da fosforilação oxidativa por redução do "deslizamento" das bombas de prótons mitocondriais ou atenuando a expressão de proteínas de desacoplamento⁵². Os achados de um estudo realizado em exercício submáximo sugerem que esta resposta pode ser derivada a partir de melhoria da respiração mitocondrial, com um aumento da relação fosfato/oxigênio, que corresponde a uma maior quantidade de ATP produzida por oxigênio consumido³⁷.



Figura 4: Possíveis efeitos do óxido nítrico no músculo esquelético. FO: Fosforilação oxidativa; P/O: Relação fosfato/oxigênio.

SUPLEMENTAÇÃO DE NITRATO, EXERCÍCIO FÍSICO E DESEMPENHO

O NO, por ser um radical livre de meia vida curta, é administrado de forma indireta, por meio de suplementos que após a ingestão são convertidos em NO. O principal deles é o nitrato que pode ser administrado tanto em forma de sal (nitrato de sódio - NaNO_3 ou nitrato de potássio - KNO_3) quanto pela ingestão de alimentos ricos em nitrato, como o suco de beterraba.

Quando em forma de sal, o NaNO_3 tem sido utilizado entre os estudos de forma predominante, em comparação ao KNO_3 , este último utilizado em apenas um estudo da presente revisão⁵³. Suas concentrações variam de 10mg/kg de peso corporal^{54, 55}, 0,1 mmol/ kg de peso corporal^{37, 56}, 0,033 mmol/kg de peso corporal (LARSEN et al 2010). Os sais são dissolvidos em água com baixa concentração de nitrato.

Porém, muitos estudos realizaram suplementação por ingestão de suco de beterraba, neste caso, a concentração varia entre 4,1 mmol e 16 mmol de nitrato (NO_3)^{51, 57, 58}. Quanto ao volume das bebidas, há uma variação entre 0,07 e 0,5L^{59, 60}

Rev. Acta Brasileira do Movimento Humano – Vol.4, n.4, p.103 -135 – Jul/Set., 2014 – ISSN 2238-2259

administrada de forma aguda (2,5h antes do exercício)⁶¹ e crônica (15 dias)⁶ onde a maior parte dos estudos suplementa durante 6 dias⁶²⁻⁶⁵.

Mediante os diferentes efeitos fisiológicos causados pelo NO, foi cogitado o seu importante papel durante o exercício físico⁵⁶. Vários pesquisadores têm investigado se a oferta de nitrato afeta parâmetros metabólicos ou circulatórios durante o exercício em seres humanos^{6, 36, 56, 66, 67}.

Dos vinte e cinco estudos avaliados na presente revisão, doze apresentaram algum tipo de melhora no desempenho esportivo, seja no tempo até a exaustão^{6, 36, 57, 61-63, 65, 68, 69}; no tempo de prova^{51, 64, 67}; na velocidade média⁷⁰; na potência pico⁶ ou na distância percorrida⁵⁸. Porém, onze estudos apresentaram uma melhora não significativa do desempenho esportivo, seja (1) no tempo até a exaustão^{54, 57, 66, 71}; (2) no tempo de prova^{59, 60, 64, 72, 73}; (3) na distância percorrida^{6, 55, 58}; (4) na taxa máxima de trabalho⁵⁶. Apenas dois estudos que avaliaram potência^{53, 74} e tempo de prova⁵³ não encontraram melhora no desempenho esportivo.

Tabela 1. Resumo dos estudos que investigaram o efeito da suplementação de NO₃ sobre o exercício físico.

Referência	Tipo de atividade / protocolo de exercício	Desenho do estudo	Amostra/ nível de aptidão	Protocolo de suplementação	VO ₂	Performance
LARSEN et al. 2007	Clicogerômetro / Teste incremental e submáximo (45, 60, 70,80 e 85% do VO _{2max}) 5min de duração cada	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens treinados	3 dias dieta com alta [NO ₃] ⁻ + supl (3x ao dia 0,033 mmol /kg de NaNO ₃ - NR) + 60' antes (NR) <i>Versus</i> 3 dias dieta com baixa [NO ₃] ⁻ + PL (NaCl) 60' antes	Média das intensidades de 45, 60, 70 e 80% do VO _{2max} . NIT:2,82±0,58l/min PL:2,9±0,57 l/min*†	Carga máxima, teste incremental (W): NIT 360,6±32,8 PL 358,9±32,3
LARSEN et al. 2010	Cicloergômetro para braço e perna / Teste incremental	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	7 homens e 2 mulheres (NR)	2 dias Dieta com baixa [NO ₃] ⁻ + supl: 3 x 0,033 mmol /kg/dia de NaNO ₃ -NR + 40' antes. <i>Versus</i> Dieta com baixa [NO ₃] ⁻ + PL (NaCl): 3 x 0,033 mmol	VO _{2max} NIT: 3,62±0,31l/min PL:3,72±0,33l/min*	Tempo até exaustão, teste incremental (s): NIT: 563 ± 30 PL: 524 ± 31

kg/dia + 0,033 mmol 40'
antes.

BAILEY et al. 2009	Cicloergômetro / Teste moderado 80% do LL (6min) e muito pesado 70%Δ (até exaustão)	Duplo-cego, <i>crossover</i>	8 homens recreacin almente treinados	6 dias Suco de beterraba 5,5 mmol/dia de NO ₃ -0,5L <i>Versus</i> Suco de Groselha(NR)	Moderado: NIT: 1,45 ± 0,1l/min PL: 1,52 ± 0,12l/min* Pesado: NIT: 3,82 ± 0,28l/min PL:3,87 ± 0,29l/min	Tempo até exaustão (s): NIT:675 ± 203 PL:583± 145
BAILEY et al. 2010	Ergômetro de extensão de joelho / Baixa intensidade 15% e Alta intensidade 30% da CVM	Randomizad o, duplo- cego, <i>crossover</i>	7 homens recreacin almente treinados	6 dias Suco de beterraba 5,5 mmol/dia de NO ₃ -0,5L <i>Versus</i> Suco de Groselha(NR)	Baixa intensidade NIT:778± 38ml/min PL:870± 42ml/min* Alta intensidade NIT:1,460±54ml/min PL:1,692± 70ml/min*	Tempo até exaustão (s): NIT:734± 109 PL:586± 80*
VANHATAL O et al. 2010	Clicoergômetro / Teste moderado 90%LL (5min) Teste incremental	Dublo-cego, <i>crossover</i>	5 homens, três mulheres (NR)	15dias Suco de beterraba 2x 5,2 mmol/dia de NO ₃ 250ml + 0,5l 2,5h antes <i>Versus</i>	90%LL NIT: 1,37± 0,23l/min PL:1,43± 0,23l/min*	Potência pico (W): NIT:331±68 PL:323±68*

Suco de Groselha(NR)

BESCOS et al. 2011	Cicloergômetro / Submáximo 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 W/kg de peso (6min) Teste incremental	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	11 homens treinados	3h antes	2,0kg de peso	Tempo até exaustão (s): NIT:416±32 PL:409±27
				10mg/kg de peso de NaNO ₃ -250ml	NIT:2,33±0,26 l/min PL:2,37± 0,23l/min	
				<i>Versus</i>	2,5kg de peso	
				10mg/kg de peso de NaCl - 250ml	NIT:2,74±0,22l/min PL:2,81±0,28l/min	
					3,0kg de peso	
					NIT:3,19±0,27l/min PL:3,29±0,29l/min	
					3,5kg de peso	
					NIT:3,68± 0,32l/min PL:3,74± 0,33l/min	
					Incremental:	
					NIT:4,64±0,35l/min PL:4,82±0,33l/min*	
LANSLEY et al. 2011	Esteira / 7 km/h (6min e 10min) 80%LL(6min)	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens recreacionistas treinados	6 dias: Suco de beterraba ~6,2 mmol de NO ₃ -0,5l/dia + 3horas antes,	7 km/h: NIT:0,70± 0,10 l/min PL:0,87 ±0,12 l/min*	Tempo até exaustão 75%Δ (s): NIT: 456±90 PL:522 ±108*

	75%Δ (6min e até exaustão)				<i>Versus</i>	80%LL NIT:2,10±0,28 l/min PL: 2,26±0,27 l/min*	Tempo até exaustão, teste incremental (s): NIT:510±48 PL:492 ±54
	Ergômetro de extensão do joelho / Teste incremental				Suco de beterraba depletado ~0,003 mmol de NO ₃ - 0,5l/dia+ 3horas antes.	75%Δ NIT:3,50±0,62 l/min PL:3,77 ±0,57 l/min*	
LANSLEY et al. 2011	Cicloergômetro / TT4 de 16.1-km	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens (NR)	~2,75h antes Suco de beterraba 6,2mmol de NO ₃ -0,5L		VO _{2max} 4km NIT:4.46±0.50l/min PL:4.36±0.47l/min	Tempo de prova 4km (s): NIT:376,2±21 PL:387±25,2*
				<i>Versus</i> Suco de beterraba depletado ~0.0047 de NO ₃ -0,5L		16km NIT:4.23±0.47 l/min PL:4.19±0.56l/min	Tempo de prova 16km (s): NIT:1.614±108 PL:1.662±126 *
VANHATAL O et al. 2011	Extensão de Joelho / Extensão até exaustão	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	7 homens, 2 mulheres moderada mente treinados	3x : 24 h, 12 h e 2.5 h antes Suco de beterraba 9.3 mmol de NO ₃ - 0,75L		NR	Tempo até exaustão (s): NIT:477 ±200 PL: 393±169*

depletado
 3x : 24 h, 12 h e 2.5 h
 antes
 ~ 0.006 mmol de NO₃

MASSCHE	Cicloergômetro /	Randomizad	15	6dias	NIT:1,95± 0,06l/min	Tempo até exaustão (s): NIT:597±22 PL: 568±23 *
LEIN et al.	Submáximo	o, cego,	homens	Suco de beterraba	PL:2,03±0,06l/min*	
2012	Teste incremental	<i>crossover</i>	moderada mente treinados	4x ~100ml 0.07 mmol/kg de peso de NO ₃ + 0,5L, 1-2 horas antes		

Versus

Suco de beterraba
 depletado
 4x ~100ml <5µmol de NO₃
 + 0,5L, 1-2 horas antes

CERMAK et	Cicloergometro /	Duplo-cego,	12	6dias	45%	Tempo de prova (s): NIT:953 ± 18 PL: 965 ± 18*
al. 2012	Submáximo	<i>crossover</i>	homens	Suco de beterraba	NIT: 1,92 ± 0,06l/min	
	45% e 65%		(NR)	2x 70ml ~8mmol de NO ₃	PL: 2,02 ± 0,09l/min*	
	Wmax (30min)			+2,5h antes 2x 70ml		
	TT 10km			~8mmol de NaNO ₃	65%	
					NIT:2,94 ± 0,12l/min	
					PL: 3,11 ± 0,12l/min*	

Versus

				Suco de beterraba depletado 2x 70ml (NR) +2,5h antes 2x 70ml NaNO ₃ depletado (NR)		
CERMAK et al. 2012	Cicloergômetro / TT~1h	Duplo-cego, <i>crossover</i>	20 homens treinados	2,5h antes Suco de beterraba 140 ml de ~8.7 mmol NO ₃	NR	Potência (W): NIT: 275 ± 7 PL: 278 ± 7
				<i>Versus</i>		
				Suco de beterraba depletado 140 ml de 0.004mmol de NO ₃		
BESCOS et al. 2012	Cicloergômetro / TT 40min	Randomizad o, duplo- cego, <i>crossover</i>	13 homens treinados	3 dias 10mg/kg de peso NaNO ₃ + 3horas antes 10mg/kg de peso NaNO ₃ (NR)	NR	Distância (km): NIT:26,4 ± 1,1 PL:26,3 ± 1,2
				<i>Versus</i>		

				10mg/kg de peso NaCl + 3horas antes 10mg/kg de peso NaCl		
BOND et al. 2012	Remo ergômetro / TT 500m	Randomizad o, <i>crossover</i>	14 homens treinados	6dias Suco de beterraba 2x 250ml/dia 5.5 mmol de NO ₃	NR	Tempo de prova (s): NIT:89,40 PL: 90,19‡
				<i>Versus</i>		
				Suco de groselha 2x 250ml/dia (depletado- NR)		
MURPHY et al. 2012	Esteira / TT 5km	duplo-cego, <i>crossover</i>	12 homens treinados	75min antes 200g de beterraba, 500 mg NO ₃	NR	Velocidade média (km/h): NIT:12,3±2,7 PL:11,9±2,6
				<i>Versus</i>		Velocidade média (km/h) 3,2-5,0km NIT:12,7±3,0 PL:12,1±2,8*
				200g oxico (depletado- NR)		

PEACOCK et al. 2012	Esteira / Submáximo ~55% do VO ₂ max e ~75% do VO ₂ max TT5km	Randomizad o, duplo- cego	10 homens (NR)	2h antes Cápsula gelatinosa de KNO ₃ (9.9 mmol/614 mg de NO ₃) <i>Versus</i> Cápsula gelatinosa de 1g Maltodextrina	~55% do VO ₂ max NIT:55 ± 5l/min PL:55 ± 5l/min ~75% do VO ₂ max NIT:73 ± 9l/min PL: 76 ± 5l/min	Tempo de prova (s): NIT:1005±53 PL:996±49
WILKERSON et al. 2012	Cicloergômetro / TT 50min	Randomizad o, cego, <i>crossover</i>	8 homens treinados	2,5h antes Suco de beterraba 0,5L de 6.2 mmol de NO ₃ <i>Versus</i> Suco de beterraba depletado 0,5L (NR)	NIT:3,6 ± 0,4l/min PL:3,7 ± 0,4 l/min	Tempo de prova (s): NIT:8.202 ± 336 PL:8.274 ± 384
CHRISTENSEN et al. 2013	Cicloergômetro / Submáximo 70%Wpico Testes de Sprints Repetidos TT 400-kcal	Randomizad o, cego, <i>crossover</i>	10 homens treinados	6dias Suco de beterraba 0,5L ~0.5 g/dia de NO ₃ + 3horas antes 0,5L ~0.5 g NO ₃	NIT:4.083± 297ml/min PL:4.106± 359 ml/min	Tempo de prova (s): NIT:1.092,0 PL:1.102,2 Potência pico(W): NIT:746±111

PL:745± 121

Versus

Suco de beterraba
depletado
0,5L (NR) + 3horas antes
0,5L (NR)

KELLY et al. 2013	Esteira / 60% Δ, 70% Δ, 80% Δ e 100% Wpico Todos até exaustão	Randomizad o, cego, <i>crossover</i>	9 homens recreacio nalmente treinados	7-12dias	60% Δ	Tempo até exaustão (s):
				Suco de beterraba 2x 250ml de 8.2mmol de NO ₃ + 250ml de 8.2mmol de NO ₃	NIT:4369± 329 ml/min PL: 4382 ± 270 ml/min	60% Δ NIT:696 ±120 PL: 593±68*
				<i>Versus</i>		
				Suco de beterraba depletado 2x 250ml ~0.006mmol de NO ₃ + 250ml de ~0.006mmol de NO ₃	70% Δ NIT:4499± 371 ml/min PL: 4405 ± 476 ml/min	70% Δ NIT: 452± 106 PL: 390 ± 86*
				Suco de beterraba depletado 2x 250ml ~0.006mmol de NO ₃ + 250ml de ~0.006mmol de NO ₃	80% Δ NIT:4222 ± 320 ml/min PL:4115 ±425 ml/min	80% Δ NIT:294 ± 50 PL: 263± 50*
					100%Wpico NIT:4180 ± 390 ml/min PL:4119 ± 420ml/min	100%Wpico NIT: 182 ± 37 PL:166± 26

MUGGERI DGE et al. 2013	Caiaque ergômetro / Submáximo 60%Wmax (15min) TT 1km	Randomizad o, <i>crossover</i>	8 homens treinados	3horas antes Suco de beterraba 70ml ~5mmol de NO ₃ <i>Versus</i> Suco de tomate 70ml ~0.01mmol de NO ₃	60%Wmax NIT: 35,6 ± 2,5ml/kg/min PL: 36,8 ± 2,4ml/kg/min*	Tempo de prova (s): NIT: 276±5s PL: 277±5s
MUGGERI DGE et al. 2014	Cicloergômetro / Submáximo 60%Wmax TT 16.1km	Randomizad o, duplo- cego, <i>crossover</i>	9 homens (NR)	3horas antes Suco de beterraba 70ml ~5mmol de NO ₃ <i>Versus</i> Suco de tomate 70ml ~0,01mmol NO ₃	NIT:2542±114 ml/min PL:2727±85 ml/min*	Tempo de prova (s): NIT: 1664±14 PL: 1702± 15
WYLIE et al. 2013	Yo-yo	Randomizad o, duplo- cego, <i>crossover</i>	14 homens treiandos	2,5h (140ml) e 1,5h (70ml) antes Suco de beterraba 4.1 mmol de NO ₃ <i>Versus</i> Suco de beterraba depletado	NR	Distância (km): NIT:1.704 ± 0,3 PL:1.636 ± 0,2 *

2,5h (140ml) e 1,5h (70ml)
antes
~0.004 mmol de NO₃

BREESE et al. 2013	Cicloergômetro / Moderado 90%LL e Muito pesado 70%Δ	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	9 homens moderada mente treinados	6dias Suco de beterraba 140ml ~8 mmol de NO ₃ <i>Versus</i> Suco de beterraba depletado 140ml ~0.003 mmol de NO ₃	90%LL NIT:1.70 ± 0.39 l/min PL:1.67 ± 0.37 l/min 70%Δ NIT:3,09 ±0,51 l/min PL:3,12 ±0,51 l/min	Tempo até exaustão (s): NIT: 521±158 PL: 635± 258*
WYLIE et al. 2013	Cicloergômetro / Moderado (80%LL) e muito pesado (75%Δ)	Randomizado, duplo-cego, <i>crossover</i>	10 homens recreacionalmente treinados	2.5 h antes Suco de beterraba 70ml ~4.2mmol de NO ₃ , 140ml ~8.42mmol de NO ₃ ou ~280ml de 16.8 mmol de NO ₃	80%LL 70ml NIT:1.61±0.21l/min PL:1.64 ±0.21l/min 140ml	Tempo até exaustão (s): 75%Δ 70ml NIT:508 ±102 PL:470 ±81

					NIT:1.64 ±0.23 l/min	
				<i>Versus</i>	PL:1.67 ± 0.21l/min	140ml
						NIT:552 ±117
				Suco de beterraba	280ml	PL:498 ± 113
				depletado	NIT: 1.60 ± 0.18 l/min	
				70ml ~0.04 mmol de NO ₃	PL:1.65±0.19 l/min*	280ml
				140ml ~0.08 mmol de NO ₃ ,		NIT:570 ± 153
				280ml ~0.12 mmol de NO ₃		PL:493 ± 114
THOMPSON	Cicloergômetro /	Randomizad	16	1,5hora antes	VO ₂	Tempo até exaustão (s):
N et al.2014	Submáximo	o, duplo-	homens	Suco de beterraba	50%	NIT: 185 ± 122
	50%, 70% e	cego,	recreaci	450ml ~5mmol de NO ₃ +	NIT: 1,68 ± 0,29 l/min	PL: 160 ± 109*
	90% VO _{2max} até	<i>crossover</i>	nalmente	50ml de suco de maçã	PL: 1,60 ± 0,26 l/min	
	exaustão		treinados			
				<i>Versus</i>	70%	
					NIT: 2,65 ± 0,40 l/min	
				Suco de maçã	PL: 2,70 ± 0,37 l/min	
				45ml + 405ml de água (NR)		
					90%	
					NIT: 3,46 ± 0,55l/min	
					PL: 3,40 ± 0,60 l/min	

H: homem; M: mulher; T: treinado; MT: moderadamente treinado; NT: não treinado; RT: recreacionalmente treinado; NR: Não referido; TT: *time-trial* (contra-relógio); NO₃: nitrato; NIT: nitrato; PL: placebo; EG: Eficiência grossa; TI: Teste incremental; LL: Limiar de lactato; CVM: Contração voluntária máxima† Valores não referidos isoladamente no artigo.

Em contra partida, boa parte dos estudos que não tiveram melhora significativa no desempenho esportivo apresentou redução no consumo de oxigênio pulmonar (VO_2)^{6, 54, 56, 57, 59, 66, 71, 73}. Os estudos que não apresentaram melhora significativa no consumo de oxigênio e desempenho foram realizados em indivíduos altamente treinados^{53, 55, 60, 64, 72, 74}. Assim, talvez isso seja explicado pelo fato de que indivíduos treinados em *endurance* apresentam maior nível basal de nitrato e nitrito que seus homólogos destreinados^{54, 75}; existindo uma provável relação com a maior atividade da NOS encontrada em sujeitos treinados⁷⁶. Além disso, esses últimos apresentam maior vascularização muscular⁷⁷ minimizando, durante o exercício, a hipoperfusão que poderia levar a redução na oxigenação e pH, necessárias para estimular a via nitrato-nitrito-NO. Por último, um estudo que avaliou a resposta da ingestão de nitrato em ratos⁷⁸, sugeriu uma preferência dessa via por fibras musculares do tipo I⁷⁹.

A ingestão oral de nitrato de sódio durante 2-3 dias mostrou redução no consumo de oxigênio pulmonar (VO_2) durante exercício submáximo⁷¹. Da mesma forma, a ingestão de 0,5L de suco de beterraba por dia durante 6 dias reduz o VO_2 durante o exercício submáximo^{6, 62, 66} e o custo de ATP na produção de força muscular, sugerindo maior eficiência contrátil³⁶. Como relatado previamente, muitos estudos encontraram redução similar no VO_2 em exercício submáximo evidente após a ingestão aguda (2,5 horas) de única dose de 0,5L de suco de beterraba que persiste por 15 dias de suplementação⁶.

Dessa forma, o nitrato surge com potencial efeito ergogênico, promovendo elevação nos tempos de exaustão em cicloergômetro em diferentes domínios metabólicos (80%LL, 80% Δ), tempo de prova em teste contra-relógio (4, 10 e 16,1km) e *yo-yo test*. Além disso, reduz o consumo de oxigênio de pico em teste incremental em cicloergômetro de braço e perna, e consumo de oxigênio durante caminhada, corrida (80% do LL e 75% do Δ), extensão de joelho (15- 30% da CVM), ciclismo (90% do LL, 45 e 65% do VO_{2max}) e canoagem (60% da potência aeróbia máxima).

Como descrito previamente, não existe consenso quanto à forma de administração de nitrato, apesar de existir uma tendência ao uso de suco de beterraba.

Por último, as diferenças nos protocolos experimentais promovem incertezas quanto aos efeitos do nitrato sobre o desempenho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O NO é um potente sinalizador celular envolvido em diversas reações no organismo. Evidências indicam que o nitrato, precursor de NO, tem uma gama de efeitos benéficos e tem demonstrado um potencial efeito ergogênico sobre o exercício. Investigações devem ser mantidas para esclarecer a dose necessária e quais grupos de atletas se beneficiariam da sua utilização.

REFERÊNCIAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6. Epub 1980/11/27.
2. Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, et al. Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide*. 2006;15(1):5-12. Epub 2005/12/27.
3. Cooper CE, Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(6):C1993-2003. Epub 2007/03/03.
4. Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis*. 1996;55(1):7-20. Epub 1996/01/01.
5. Schmidt HH, Klein MM, Niroomand F, Bohme E. Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide? *Eur J Pharmacol*. 1988;148(2):293-5. Epub 1988/03/29.
6. Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Pavey TG, Wilkerson DP, et al. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(4):R1121-31. Epub 2010/08/13.
7. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):715-9. Epub 2000/09/07.
8. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998;336 (Pt 1):1-17. Epub 1998/11/10.
9. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994;23(6 Pt 2):1121-31. Epub 1994/06/01.
10. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, et al. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1995;95(4):1747-55. Epub 1995/04/01.
11. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66(6):1561-75. Epub 1990/06/01.
12. Schulz E, Anter E, Keaney JF, Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1093-104. Epub 2004/05/12.
13. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*. 2004;561(Pt 1):1-25. Epub 2004/09/18.
14. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 2003;54(4):469-87. Epub 2004/01/17.
15. Alonso D, Radomski MW. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Fail Rev*. 2003;8(1):47-54. Epub 2003/03/26.
16. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N37-52. Epub 2000/05/12.
17. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II27-33. Epub 2004/06/03.
18. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(3):395-400. Epub 2004/06/30.
19. 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*. 1976;14(6):545-8. Epub 1976/12/01.
20. Tannenbaum SR, Weisman M, Fett D. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol*. 1976;14(6):549-52. Epub 1976/12/01.

21. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med.* 1995;1(6):546-51. Epub 1995/06/01.
22. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 1999;454(1-2):127-30. Epub 1999/07/21.
23. Nohl H, Staniek K, Sobhian B, Bahrami S, Redl H, Kozlov AV. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):913-21. Epub 2002/05/09.
24. Reutov VP, Sorokina EG. NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry (Mosc).* 1998;63(7):874-84. Epub 1998/08/29.
25. Vanhatalo A, Fulford J, DiMenna FJ, Jones AM. Influence of hyperoxia on muscle metabolic responses and the power-duration relationship during severe-intensity exercise in humans: a 31P magnetic resonance spectroscopy study. *Exp Physiol.* 2010;95(4):528-40. Epub 2009/12/24.
26. Gilchrist M, Winyard PG, Benjamin N. Dietary nitrate--good or bad? *Nitric Oxide.* 2010;22(2):104-9. Epub 2009/10/31.
27. Ignarro LJ, Adams JB, Horwitz PM, Wood KS. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J Biol Chem.* 1986;261(11):4997-5002. Epub 1986/04/15.
28. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006(176 Pt 1):213-54. Epub 2006/09/27.
29. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2001;1(8):1397-406. Epub 2001/08/23.
30. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1994;356(2-3):295-8. Epub 1994/12/19.
31. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994;345(1):50-4. Epub 1994/05/23.
32. Bolanos JP, Peuchen S, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 1994;63(3):910-6. Epub 1994/09/01.
33. Galler S, Hilber K, Gobesberger A. Effects of nitric oxide on force-generating proteins of skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 1997;434(3):242-5. Epub 1997/07/01.
34. Wong GK, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(1):215-20. Epub 1996/01/01.
35. Merry TL, Lynch GS, McConell GK. Downstream mechanisms of nitric oxide-mediated skeletal muscle glucose uptake during contraction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(6):R1656-65. Epub 2010/10/15.
36. Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, Winyard PG, Blackwell JR, DiMenna FJ, et al. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2010;109(1):135-48. Epub 2010/05/15.
37. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, et al. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab.* 2011;13(2):149-59. Epub 2011/02/03.
38. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(1):97-104. Epub 2009/10/21.
39. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12814-9. Epub 2001/10/19.
40. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(9):3375-8. Epub 1989/05/01.

41. Shen W, Tian R, Saupe KW, Spindler M, Ingwall JS. Endogenous nitric oxide enhances coupling between O₂ consumption and ATP synthesis in guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(2):H838-46. Epub 2001/07/17.
42. Martin E Young BL. Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP – evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters*. 1998;424(1-2):79–83.
43. Lau KS, Grange RW, Isotani E, Sarelius IH, Kamm KE, Huang PL, et al. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Genomics*. 2000;2(1):21-7. Epub 2000/10/04.
44. Kingwell BA, Formosa M, Muhlmann M, Bradley SJ, McConell GK. Nitric oxide synthase inhibition reduces glucose uptake during exercise in individuals with type 2 diabetes more than in control subjects. *Diabetes*. 2002;51(8):2572-80. Epub 2002/07/30.
45. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*. 1994;372(6506):546-8. Epub 1994/12/08.
46. Morrison RJ, Miller CC, 3rd, Reid MB. Nitric oxide effects on shortening velocity and power production in the rat diaphragm. *J Appl Physiol (1985)*. 1996;80(3):1065-9. Epub 1996/03/01.
47. Murrant CL, Woodley NE, Barclay JK. Effect of nitroprusside and endothelium-derived products on slow-twitch skeletal muscle function in vitro. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994;72(9):1089-93. Epub 1994/09/01.
48. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(2):657-62. Epub 1999/01/20.
49. Hart JD, Dulhunty AF. Nitric oxide activates or inhibits skeletal muscle ryanodine receptors depending on its concentration, membrane potential and ligand binding. *J Membr Biol*. 2000;173(3):227-36. Epub 2000/02/10.
50. Heunks LM, Cody MJ, Geiger PC, Dekhuijzen PN, Sieck GC. Nitric oxide impairs Ca²⁺ activation and slows cross-bridge cycling kinetics in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;91(5):2233-9. Epub 2001/10/20.
51. Cermak NM, Gibala MJ, van Loon LJ. Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2012;22(1):64-71. Epub 2012/01/18.
52. Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E. Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(2):158-66. Epub 2007/04/21.
53. Peacock O, Tjonna AE, James P, Wisloff U, Welde B, Bohlke N, et al. Dietary nitrate does not enhance running performance in elite cross-country skiers. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(11):2213-9. Epub 2012/08/10.
54. Bescos R, Rodriguez FA, Iglesias X, Ferrer MD, Iborra E, Pons A. Acute administration of inorganic nitrate reduces VO₂(peak) in endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(10):1979-86. Epub 2011/03/17.
55. Bescos R, Ferrer-Roca V, Galilea PA, Roig A, Drobnic F, Sureda A, et al. Sodium nitrate supplementation does not enhance performance of endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(12):2400-9. Epub 2012/07/20.
56. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;191(1):59-66. Epub 2007/07/20.
57. Wylie LJ, Kelly J, Bailey SJ, Blackwell JR, Skiba PF, Winyard PG, et al. Beetroot juice and exercise: pharmacodynamic and dose-response relationships. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115(3):325-36. Epub 2013/05/04.
58. Wylie LJ, Mohr M, Krstrup P, Jackman SR, Ermiotadis G, Kelly J, et al. Dietary nitrate supplementation improves team sport-specific intense intermittent exercise performance. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(7):1673-84. Epub 2013/02/02.
59. Mugggeridge DJ, Howe CC, Spendiff O, Pedlar C, James PE, Easton C. The effects of a single dose of concentrated beetroot juice on performance in trained flatwater kayakers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2013;23(5):498-506. Epub 2013/04/13.

60. Wilkerson DP, Hayward GM, Bailey SJ, Vanhatalo A, Blackwell JR, Jones AM. Influence of acute dietary nitrate supplementation on 50 mile time trial performance in well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol.* 2012;112(12):4127-34. Epub 2012/04/25.
61. Kelly J, Fulford J, Vanhatalo A, Blackwell JR, French O, Bailey SJ, et al. Effects of short-term dietary nitrate supplementation on blood pressure, O₂ uptake kinetics, and muscle and cognitive function in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304(2):R73-83. Epub 2012/11/24.
62. Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of walking and running: a placebo-controlled study. *J Appl Physiol (1985).* 2011;110(3):591-600. Epub 2010/11/13.
63. Masschelein E, Van Thienen R, Wang X, Van Schepdael A, Thomis M, Hespel P. Dietary nitrate improves muscle but not cerebral oxygenation status during exercise in hypoxia. *J Appl Physiol (1985).* 2012;113(5):736-45. Epub 2012/07/10.
64. Bond H, Morton L, Braakhuis AJ. Dietary nitrate supplementation improves rowing performance in well-trained rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2012;22(4):251-6. Epub 2012/06/20.
65. Breese BC, McNarry MA, Marwood S, Blackwell JR, Bailey SJ, Jones AM. Beetroot juice supplementation speeds O₂ uptake kinetics and improves exercise tolerance during severe-intensity exercise initiated from an elevated metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;305(12):R1441-50. Epub 2013/10/04.
66. Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, Blackwell JR, Dimenna FJ, Wilkerson DP, et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2009;107(4):1144-55. Epub 2009/08/08.
67. Lansley KE, Winyard PG, Bailey SJ, Vanhatalo A, Wilkerson DP, Blackwell JR, et al. Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(6):1125-31. Epub 2011/04/08.
68. Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, Blackwell JR, Winyard PG, Jones AM. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. *J Physiol.* 2011;589(Pt 22):5517-28. Epub 2011/09/14.
69. Thompson KG, Turner L, Prichard J, Dodd F, Kennedy DO, Haskell C, et al. Influence of dietary nitrate supplementation on physiological and cognitive responses to incremental cycle exercise. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014;193:11-20. Epub 2014/01/07.
70. Murphy M, Eliot K, Heuertz RM, Weiss E. Whole beetroot consumption acutely improves running performance. *J Acad Nutr Diet.* 2012;112(4):548-52. Epub 2012/06/20.
71. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(2):342-7. Epub 2009/11/17.
72. Christensen PM, Nyberg M, Bangsbo J. Influence of nitrate supplementation on VO₂ kinetics and endurance of elite cyclists. *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23(1):e21-31. Epub 2012/10/02.
73. Muggenridge DJ, Howe CC, Spendiff O, Pedlar C, James PE, Easton C. A single dose of beetroot juice enhances cycling performance in simulated altitude. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46(1):143-50. Epub 2013/07/13.
74. Cermak NM, Res P, Stinkens R, Lundberg JO, Gibala MJ, van Loon LJ. No improvement in endurance performance after a single dose of beetroot juice. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2012;22(6):470-8. Epub 2012/07/19.
75. Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm A. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol (1985).* 1997;82(3):760-4. Epub 1997/03/01.
76. Wadley GD, Choate J, McConell GK. NOS isoform-specific regulation of basal but not exercise-induced mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 2007;585(Pt 1):253-62. Epub 2007/10/06.
77. Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2004;557(Pt 2):571-82. Epub 2004/03/17.

78. Hernandez A, Schiffer TA, Ivarsson N, Cheng AJ, Bruton JD, Lundberg JO, et al. Dietary nitrate increases tetanic $[Ca^{2+}]_i$ and contractile force in mouse fast-twitch muscle. *J Physiol*. 2012;590(Pt 15):3575-83. Epub 2012/06/13.
79. Tesch PA, Karlsson J. Muscle fiber types and size in trained and untrained muscles of elite athletes. *J Appl Physiol* (1985). 1985;59(6):1716-20. Epub 1985/12/01.