



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RENATA SELVATICI BORGES JANUÁRIO

**SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE L-CITRULINA EM
HUMANOS:
IMPLICAÇÕES NA CAPACIDADE DE REALIZAR EXERCÍCIO
FÍSICO MÁXIMO**

RENATA SELVATICI BORGES JANUÁRIO

**SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE L-CITRULINA EM
HUMANOS:
IMPLICAÇÕES NA CAPACIDADE DE REALIZAR EXERCÍCIO
FÍSICO MÁXIMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito à obtenção do título de Doutora em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Ricardo Altimari

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Januário , Renata Selvatici Borges.

Suplementação aguda de L-citrulina em humanos : implicações na capacidade de realizar exercício físico máximo / Renata Selvatici Borges Januário . - Londrina, 2018. 83 f. : il.

Orientador: Leandro Ricardo Altimari .

Coorientador: Cosme Franklim Buzzachera .

Tese (Doutorado em Educação Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Educação Física e Esportes, Programa de Pós-Graduação em Educação Física, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Óxido nítrico - Tese. 2. L-citrulina - Tese. 3. L-arginina - Tese. 4. Exercício físico - Tese. I. Altimari , Leandro Ricardo . II. Buzzachera , Cosme Franklim . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Educação Física e Esportes. Programa de Pós-Graduação em Educação Física. IV. Título.

RENATA SELVATICI BORGES JANUÁRIO

**SUPLEMENTAÇÃO AGUDA DE L-CITRULINA EM HUMANOS:
IMPLICAÇÕES NA CAPACIDADE DE REALIZAR EXERCÍCIO FÍSICO
MÁXIMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Associado em Educação Física UEM/UEL, como requisito à obtenção do título de Doutora em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Leandro Ricardo Altimari
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Crivaldo Gomes Cardoso Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ademar de Almeida Junior
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Andreo Fernando Aguiar
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof. Dr. Juliano Casonatto
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 26 de Março de 2018.

JANUÁRIO, Renata Selvatici Borges. **Suplementação aguda de L-citrulina em humanos: implicações na capacidade de realizar exercício físico máximo.** 2018. 83 f. Tese (Doutorado em Educação Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A citrulina ($C_6H_{13}N_3O_3$), aminoácido não protéico e neutro, têm despertado o interesse da comunidade clínica e acadêmica, devido aos seus efeitos de importância biológica no âmbito da saúde. A citrulina têm despertado ainda o interesse de pesquisadores no contexto do exercício físico. Atuando como agente ergogênico, a suplementação de citrulina parece otimizar a capacidade para realizar exercício físico em humanos, primariamente por mecanismos de ação associados com a produção de arginina e óxido nítrico, o qual, por sua vez, regula vários efeitos fisiológicos no organismo, como tonicidade vascular, contratilidade muscular, biogênese e respiração mitocondrial, homeostase de cálcio e glicose, entre outros. Apesar de seus vantajosos mecanismos de ação, em certos casos, a citrulina parece não otimizar a capacidade para realizar exercício físico em humanos. As razões para estas incertezas a respeito de seus efeitos ergogênicos no contexto do exercício físico são, todavia, pouco claros, mas podem depender, pelo menos parcialmente, das dosagens de citrulina usadas nos estudos precedentes. Para examinar tal hipótese, elaborou-se a presente proposta, composta por dois manuscritos científicos originais. O primeiro manuscrito examinou os efeitos de diferentes doses da suplementação aguda de citrulina sobre a capacidade de realizar exercício físico – e suas respostas fisiológicas associadas - em adultos jovens, fisicamente ativos. Em suma, os achados deste estudo mostraram que a suplementação aguda de citrulina não afetou a capacidade de realizar exercício físico – e suas respostas fisiológicas associadas – em humanos, independentemente da dose administrada. Mudanças na [arginina] plasmática, todavia, parecem ser dose-dependente. O segundo manuscrito, por sua vez, examinou, de modo detalhado, os efeitos fisiológicos associados com diferentes doses da suplementação de citrulina durante exercício físico com cargas incrementais (rampa) em ciclo ergômetro, com ênfase em respostas dinâmicas do consumo de oxigênio pulmonar e (des)oxigenação muscular. Em suma, a suplementação aguda com citrulina foi incapaz de otimizar os processos fisiológicos entre disponibilidade e utilização de oxigênio pela musculatura ativa durante exercício físico com cargas incrementais (rampa) em humanos.

Palavras-chave: Óxido nítrico. L-citrulina. L-arginina. Exercício físico.

JANUÁRIO, Renata Selvatici Borges. **Acute L-citrulline supplementation in humans: effects on maximal exercise performance.** 2018. 83 p. Thesis (Doctoral Degree in Physical Education) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Citrulline ($C_6H_{13}N_3O_3$), a non-protein and neutral amino acid, has been focus of basic, applied, and clinical research over the last few years. In the exercise context, citrulline might have potential ergogenic effects in humans, probably because of its mechanisms of action related to arginine and nitric oxide pathways, which, in turn, are responsible to regulate, at least in part, a number of physiological processes such as vascular tone, cellular calcium handling, skeletal muscle glucose uptake, mitochondrial respiration, muscle contractility and neurotransmission. Despite its potential ergogenic effects, a number of studies have failed to report any changes in physiological responses as well as improvements in exercise performance following chronic or acute supplementation with citrulline. The reasons are unclear, but obviously may be related to dose regimens. To examine this hypothesis, the current doctoral thesis was composed by two original manuscripts. The first study was designed to examine the acute effects of different oral doses of *L*-citrulline on plasma *L*-arginine and *L*-arginine availability, physiological responses to exercise and exercise performance, compared with energy-matched placebo, in a group of moderately trained young adults. In summary, this study showed that acute supplementation with *L*-citrulline does not modify physiological responses or improve exercise tolerance during a non-steady-state, incremental ramp exercise in moderately trained young adults. However, W_{max} and time to fatigue were significantly correlated with Δ in plasma [*L*-arginine], suggesting a potential indirect role of plasma [*L*-arginine] availability on exercise performance in humans. The second study, in turn, was designed to examine the acute effects of supplementation with citrulline on the regulation of both \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ that across exercise intensities in humans. In summary the results of this study showed that acute supplementation with *L*-citrulline does not influence the dynamic adjustment of oxygen delivery and oxygen utilization as well as on the pattern of deoxy-[Hb + Mb] during ramp or incremental step exercise in humans.

Keywords: Nitric oxide. *L*-citrulline. *L*-arginine. Exercise.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	13
3.1	OBJETIVO GERAL.....	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4	REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1	PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DA CITRULINA.....	14
4.2	METABOLISMO DA CITRULINA	17
4.2.1	Ornitina Carbamoiltransferase (OCT).....	18
4.2.2	Óxido Nítrico Sintetase (NOS).....	19
4.2.3	Argininosuccinato Sintetase (ASS).....	20
4.3	MECANISMOS DE AÇÃO DA CITRULINA.....	21
4.3.1	Transporte da citrulina.....	21
4.3.2	Absorção, Síntese, e Catabolismo da citrulina	26
4.4	SUPLEMENTAÇÃO DE CITRULINA COMO AGENTE TERAPÊUTICO	24
4.5	SUPLEMENTAÇÃO DE CITRULINA COMO AGENTE ERGOGÊNICO.....	28
4.5.1	Suplementação aguda de citrulina e desempenho físico	29
4.5.2	Suplementação crônica de citrulina e desempenho físico.....	31
5	RESULTADOS	33
5.1	ESTUDO 1 – Effects of <i>L</i>-citrulline supplementation on exercise performance in humans: A dose-response study	33
5.1.1	Introdução	34
5.1.2	Material e Métodos	36
5.1.3	Resultados	41
5.1.4	Discussão	42
5.1.5	Conclusão	45

5.2	ESTUDO 2 – Effects of acute <i>L</i>-citrulline supplementation on adjustments of pulmonary O₂ uptake and muscle deoxygenation during ramp incremental exercise in young adults.....	48
5.2.1	Introdução.....	49
5.2.2	Material e Métodos.....	53
5.2.3	Resultados.....	60
5.2.4	Discussão.....	61
5.2.5	Conclusão.....	63
5.2.6	Legendas Tabelas/Figuras.....	64
5.2.7	Tabelas/Figuras.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Numerosas terapias capazes de estimular a produção de óxido nítrico no organismo humano foram propostas nas últimas décadas (VANHOUTTE et al., 2016). O óxido nítrico, sintetizado pela conversão de nitrato e nitrito (LUNDBERG et al., 2009) e/ou pela oxidação da arginina em uma reação catalisada por enzimas óxido nítrico sintetase (ZHAO et al., 2015), controla numerosos efeitos fisiológicos no organismo, incluindo tonicidade vascular, contratilidade muscular, homeostase de cálcio e glicose, biogênese e respiração mitocondrial, dentre outros (STAMLER et al., 2001; COOPER et al., 2007). A suplementação dietética com nitrato ou compostos ricos em nitrato, como o suco de beterraba, por exemplo, estimula a formação de óxido nítrico e promove efeitos de importância biológica (BAILEY et al., 2012), como uma redução na tonicidade vascular (SIERVO et al., 2013), tornando-se uma estratégia terapêutica de relevância no âmbito clínico. A suplementação dietética de nitrato - ou compostos ricos em nitrato - também promove efeitos notáveis no contexto do exercício físico (JONES, 2014). De fato, a suplementação aguda ou crônica de nitrato resulta em uma melhor eficiência e maior tolerância ao esforço físico em humanos (LARSEN et al., 2007, 2011; BAILEY et al., 2009, 2010; LANSLEY et al., 2011). A suplementação com arginina, um conhecido precursor do óxido nítrico, opostamente, possui resultados contraditórios na literatura científica no que se refere ao seu papel como agente preventivo (SHAH et al., 2007), terapêutico (DONG et al., 2011), ou mesmo ergogênico (ALVARES et al., 2011). Embora as razões para tais achados contrastantes permaneçam ainda incertas, sabe-se que, particularmente no contexto do exercício físico, um aumento na formação de óxido nítrico estimulado pela suplementação de arginina causa uma melhora na eficiência

e na tolerância ao esforço físico (SCHAEFER et al., 2002; BAILEY et al., 2010); contudo, a incapacidade de aumento na formação de óxido nítrico torna a suplementação de arginina inócua como um agente ergogênico (BÉSCOS et al., 2009; KOPPO et al., 2009; LIU et al., 2009; VANHATALO et al., 2013).

Para exercer seus efeitos ergogênicos, a suplementação de arginina deve enfrentar uma série de obstáculos, incluindo os diversos processos de degradação e eliminação pré-sistêmicos e sistêmicos. De fato, estima-se que ~40% da arginina ingerida por via oral é catabolizada por bactérias e enzimas *arginases* no trato digestório (CASTILLO et al., 1993), enquanto ~10-15% da substância sofre ainda metabolização pelo fígado (O'SULLIVAN, et al., 1998; MORRIS JR 2016). Além dos obstáculos referentes ao processo digestivo, outro desafio ocorre na circulação sistêmica, onde a arginina compete pelo carreador y^+ com seus análogos e a *dimetilarginina* assimétrica, reduzindo assim a sua captação tecidual (CLOSS et al., 1997). Talvez por tais motivos, especula-se que apenas ~1% de uma dose oral de arginina é usada como substrato para as enzimas óxido nítrico sintetase (BØGER et al., 2004). Dessa maneira, pode-se acreditar que a suplementação oral de arginina, aguda ou crônica, não é um tratamento eficaz para se estimular a formação de óxido nítrico em humanos.

Diferentemente da arginina, a suplementação de citrulina, um aminoácido neutro e não protéico, é apontada como uma estratégia eficaz para aumentar a produção de óxido nítrico em humanos. Especificamente, a citrulina é formada como um produto final da atividade da família de enzimas óxido nítrico sintetase (MORRIS JR 2016); a citrulina gerada, então, pode ser transformada em arginina na circulação sistêmica

pelo ciclo do óxido nítrico, em um processo denominado síntese *de novo* da arginina (PASTOR et al., 1995). Cabe notar que, em termos metabólicos, a citrulina possui uma enorme vantagem sobre a arginina. Atuando como uma forma oculta de arginina, a *citrulina* ultrapassa o fígado, pois o tecido hepático é incapaz de capturar o aminoácido na circulação porta (WINDMUELLER; SPAETH, 1981). A citrulina, então, é convertida em arginina pelos rins, liberando-a na circulação sanguínea para atuar nos diferentes tecidos corporais (MORRIS JR, 2016). Cabe notar ainda que a citrulina possui carreadores genéricos, dessa maneira, não competindo pelo carreador y^+ com *dimetilarginina* assimétrica e análogos de arginina (CLOSS et al, 1997). Tal vantagem metabólica contribui para os achados de maior eficiência da suplementação oral de citrulina no aumento das concentrações plasmáticas (KUHN et al., 2002; OSOWSKA et al, 2004) e teciduais (WIJNANDS et al., 2012) de arginina, comparativamente a própria suplementação oral de arginina. De fato, estudos recentes estimam que ingerir 3–6 g de citrulina resulta em um aumento de cerca de 50% na concentração plasmática de arginina em adultos saudáveis e cerca de 60% em pacientes hemofílicos (CURIS et al., 2007). Neste contexto, pode-se assumir que suplementação oral de citrulina é um tratamento eficaz para se estimular a formação de óxido nítrico – e seu precursor, arginina - em humanos.

Nos últimos anos, verificou-se um maior interesse da comunidade científica no estudo – e uso - da citrulina como um potencial agente ergogênico no contexto do exercício físico (BÉSCOS et al., 2012). De fato, a citrulina, pura ou combinado com malato, um intermediário do ciclo tricarboxílico capaz de oxidar nutrientes para formar ATP, pode otimizar a capacidade de realizar exercício físico em humanos (BENDAHAN et al, 2002). Os mecanismos de ação para os efeitos ergogênicos da

substância são incertos, mas especulações existem (FIGUEROA et al., 2017). De fato, as principais fontes para a citrulina plasmática são, nomeadamente, arginina e glutamina, ambas enormemente catabolizadas nos intestinos (BREUILLARD et al., 2015), além da ingestão exógena de citrulina pelos alimentos (MOINARD et al., 2008). Após a formação de arginina através da citrulina nos rins, parte da arginina *de novo* é liberada na circulação sanguínea como um substrato para a formação do óxido nítrico, o qual, conforme mencionado anteriormente, regula diversos efeitos fisiológicos de relevância ímpar no contexto do exercício físico (STAMLER et al., 2001). Além disso, sabe-se que a uréia é essencial na eliminação de nitrogênio (amônia) no fígado. No ciclo da uréia, a arginina produzida através da citrulina é catabolizada pela enzima arginase em dois compostos, ornitina e uréia. A suplementação de citrulina parece aumentar a homeostase da amônia (BREUILLARD et al., 2015), causando, por conseguinte, um decréscimo na concentração de amônia na circulação sanguínea, um composto rotineiramente associado com a fadiga muscular periférica – ocasionado por sua aumentada ativação da glicólise anaeróbica e produção de ácido láctico (SPRIET e HARGREAVES, 2006; ALLEN et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

De modo surpreendente, a literatura científica possui achados contraditórios a respeito dos potenciais efeitos ergogênicos da suplementação oral de citrulina em humanos. De fato, em um estudo recente, CUTRUFELLO et al (2015) demonstraram que a ingestão aguda de citrulina (6 g) 1 - 2 horas antes de um teste de exercício físico com cargas incrementais pouco afetou o consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$) e o tempo até a exaustão em adultos jovens, saudáveis. Não obstante, verificou-se ainda nenhum efeito ergogênico da citrulina no limiar anaeróbico, sugerindo, por conseguinte, que o fornecimento de ATP para a demanda da musculatura ativa através da glicólise anaeróbica pouco modificou-se, apesar do especulado decréscimo na concentração de amônia no sangue (BREUILLARD et al, 2015). Tais achados foram corroborados por outros estudos recentes (TARAZONA-DIAZ, et al., 2013; CHURCHWARD-VENNE et al., 2014; KIM et al, 2015). Opostamente, BAILEY et al. (2015) examinaram os efeitos de 7–16 d de suplementação de citrulina (6g) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) e oxigenação muscular durante exercício físico moderado e vigoroso em homens adultos, ativos. Os autores notaram que o $\dot{V}O_2$ permaneceu inalterado durante exercício físico moderado e vigoroso. Todavia, padrões diferenciados na oxigenação muscular, mensurados por espectroscopia por infravermelho proximal, sugeriram potenciais efeitos ergogênicos da suplementação de citrulina no desempenho físico em humanos (BAILEY et al., 2015), corroborando outros estudos recentes (BAILEY et al., 2016; SUZUKI et al., 2016).

A razão para tais achados contraditórios na literatura é incerta; contudo, obviamente, diferenças na dosagem da administração da citrulina pode ter resultado em achados controversos (MOINARD et al., 2008). Dessa maneira, a presente tese será elaborada para suprir tal lacuna literária, determinando os potenciais efeitos de diferentes doses de suplementação de citrulina sobre respostas dinâmicas do consumo de oxigênio pulmonar e oxigenação muscular durante esforço físico com cargas incrementais em adultos jovens, fisicamente ativos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos de diferentes doses da suplementação aguda de citrulina sobre a performance e respostas dinâmicas do consumo de oxigênio pulmonar e oxigenação muscular durante exercício físico com cargas incrementais em adultos jovens, ativos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudo 1. Determinar os efeitos de diferentes doses da suplementação oral aguda de citrulina sobre o desempenho (tempo até exaustão e W_{max}), respostas metabólicas e de troca gasosa durante exercício físico com cargas incrementais em adultos jovens, fisicamente ativos.

Estudo 2. Determinar os efeitos de diferentes doses da suplementação oral aguda de citrulina sobre a relação entre disponibilidade e utilização de oxigênio, via respostas dinâmicas do consumo de oxigênio pulmonar e hemodinâmicos periféricos em adultos jovens, fisicamente ativos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas, a citrulina ($C_6H_{13}N_3O_3$) recebeu pouca atenção dos pesquisadores e profissionais na área da saúde, muito provavelmente por não se tratar de um aminoácido proteico com reconhecidos efeitos preventivos e terapêuticos. Mais recentemente, contudo, a citrulina vêm despertando o interesse da comunidade acadêmica e clínica, revelando efeitos promissores no âmbito da saúde em humanos. Neste sentido, a primeira parte desta revisão de literatura busca abordar as principais propriedades físicas e químicas da citrulina, proporcionando uma maior compreensão de seu metabolismo e mecanismo de ação em sistemas biológicos em seres humanos e animais. As implicações deste aminoácido no contexto das ciências da saúde serão brevemente destacadas. Finalmente, na segunda parte desta revisão de literatura, os efeitos da citrulina sobre a capacidade para realizar exercício físico serão elucidados.

4.1 PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DA CITRULINA

A citrulina (registro CAS: 372-75-8) é um composto sólido incolor em uma temperatura e pressão ambiente, com um ponto de fusão registrado em $222^{\circ}C$. Sendo um α -amino ácido com um carbono assimétrico, possui dois enantiômeros. Sua forma natural é a L (dextrogiro $[\alpha^{20}_D] = 3.7^{\circ}$, com configuração absoluta S), igualmente a muitos outros aminoácidos. A citrulina existe ainda como um sal, em sua forma catiônica, como por exemplo o cloridrato de citrulina, outro composto em dextrogiro $[\alpha^{20}_D] = 17.9^{\circ}$ (TOFFOLI et al., 1987). Possui uma estrutura cristalina, com complexas propriedades químicas. De fato, possuindo uma massa molar de 175 g .

mol^{-1} , suas propriedades químicas não resultam unicamente de sua função aminoácido, mas também do grupo ureído da cadeia alifática que substitui o carbono- α . Assim, devido a sua cadeia polar lateral, a citrulina é relativamente hidrofílica, mas pouco solúvel em metanol e etanol (possui um coeficiente de partição entre octanol e água igual a $\log P = -3.19 \pm 0.11$ (PLISKA et al., 1981). Em termos de equilíbrio ácido-básico Brønsted-Lowry, possui dois valores de pKa: 2,4 para o grupo ácido carboxílico e 9,4 para o grupo amino, comuns a todos os aminoácidos; o seu pKa, todavia, varia entre 2.1 e 2.4 para pKa1 e entre 8.6 e 9.7 para Pka2, dependendo das condições experimentais (STEGGLISH et al., 2000). Cabe notar que a citrulina é um diácido, e assim, considerando as suas micro-acidezes, sua forma neutra predominante é a zwitteriana (> 99.9%; NOSZÁL e KASSAI-TÁNCZOS, 1991). Cabe notar ainda que em um pH alcalino, ambos os grupos, ácido carboxílico e amino, atuam como ácido de Lewis, formando assim complexos com cátions metálicos, como o complexo ternário $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{His})(\text{Cit})]$ (YAMAUCHI et al, 1979); o interesse biológico destes complexos, todavia, tem sido questionado na literatura científica (CURIS et al., 2005).

A citrulina possui a reatividade comum de um membro da família α -aminoácido, sendo capaz de formar ligações peptídicas e incorporar-se em uma proteína, tornando-a, por conseguinte, uma “proteína citrulinada”. A maior parte da reatividade, contudo, deriva de seu grupo ureído terminal, o qual possui relação próxima com o grupo funcional da arginina (TOFFOLI et al., 1987). A reatividade do grupo resulta de seu átomo de carbono, fortemente eletrofílico, com elétrons atraídos pelos átomos de nitrogênio e oxigênio na sua proximidade. Assim, um composto nucleófilo R, relativamente fraco, reage com o carbono para formar um intermediário estável,

$\text{N}_2\text{C(R)O}^-$, o qual será posteriormente estabilizado pela expulsão de um de seus quatro ligantes: NH_3 , R (nenhuma reação), R- NH_2 (formando ornitina) ou água. Todas as reações ocorrem na presença de ions doadores e aceitadores de prótons (CURIS et al, 2005). Sob uma perspectiva biológica, a reação mais importante possui o aspartato como composto nucleofílico R, formando, assim, argininosuccinato no ciclo da uréia (MORRIS 2006). As reações citadas, contudo, podem ocorrer na direção oposta, formando citrulina como um produto final. Este é o *modus operandi* da preparação industrial da citrulina através da arginina, usando água como nucleófilo e amônia como grupo deslocado. Biologicamente, o grupo deslocado pode ser um fosfato – no ciclo da uréia, após condensação da ornitina via carbamoil fosfatase – ou óxido nítrico (MORRIS, 2007).

A quantificação da citrulina em tecidos biológicos, atualmente, pode ser feita por várias técnicas, as quais podem ser categorizadas em dois grupos: métodos de quantificação de aminoácidos genéricos ou específicos para a citrulina (NEVEUX et al, 2004). De fato, métodos genéricos de quantificação de aminoácidos fundamentam-se na detecção da função do aminoácido. Não específicos por natureza, tais métodos são agrupados por técnicas de separação de fluídos biológicos, como cromatografia líquida de eficiência alta (HPLC; MARTENS-LOBENHOFFER; BODE-BØGER, 2003). Métodos específicos, por sua vez, fundamentam-se na quantificação da uréia, onde a citrulina atua como uma ureia substituída. Assim, mesmo resíduos de citrulina em proteínas podem ser detectados (SUGAWARA et al., 1998). A aparente vantagem técnica, porém, desaparece na medida em que a diferenciação entre citrulina livre e resíduos de citrulina torna-se inexequível, superestimando, por conseguinte, concentrações de citrulina em células

e tecidos. Os métodos mencionados acima, genéricos ou específicos, possuem outra desvantagem, referente a uma visão meramente estática da quantidade de citrulina em uma amostra, negligenciando, assim, fluxos de citrulina e taxa de síntese de metabólitos de citrulina, proporcionados pela técnica de marcação isotópica (KEILHOFF; WOLF, 2003; CASTILLO, et al., 1993).

Independentemente do método de quantificação da citrulina, sabe-se atualmente que a citrulina – devido a sua clara relação com a arginina – é encontrada em quase todos os organismos vivos, diferenciando-se apenas em termos de concentração e funções (WU; MEININGER, 2008). De fato, em microrganismos, como bactérias e nematóides parasíticos, a citrulina é usada como fonte de carbono e energia. Como em mamíferos, duas enzimas chave, ornitina carbamoiltransferase e argininosuccinato sintetase, são responsáveis por regular vias metabólicas da citrulina nestes microrganismos. Porém, um estudo aprofundado destas enzimas será feito no próximo tópico desta revisão de literatura. Cabe apenas salientar ainda que a citrulina faz-se presente no reino plantae. Concentrações altas de citrulina são encontradas em cucurbitáceas, como a melância (*citrullus vulgaris* – origem do seu nome), e certas algas, como a *grateloupia vulgaris*, atuando no transporte nitrogenado (LUDWIG, 1993) e na proteção ao estresse oxidativo (AKASHI et al., 2001).

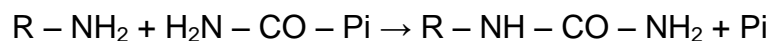
4.2 METABOLISMO DA CITRULINA

Duas enzimas são responsáveis por regular a síntese da citrulina em seres humanos: ornitina carbamoiltransferase (OCT; número EC 2.1.3.3) e óxido nítrico

(NO) sintetase (NOS; número EC 1.14.13.39, incluindo as suas isoenzimas) (MORRIS, 2006). Somente uma enzima, argininosuccinato sintetase (ASS; número EC 6.3.4.5, conhecida ainda como citrulina-aspartato ligase), porém, cataboliza a citrulina em seres humanos. Uma discussão mais detalhada de cada uma destas enzimas do metabolismo da citrulina é apresentada nos subtópicos a seguir.

4.2.1 Ornitina Carbamoiltransferase (OCT)

OCT, ou ornitina transcarbamilase, é encontrada nos diferentes reinos biológicos, pois é uma enzima chave para a síntese e degradação de arginina. Particularmente, a OCT é uma enzima chave no ciclo da uréia, catalisando a conversão de ornitina em citrulina, conforme a reação a seguir (WU; MORRIS JR, 1998):



Onde Pi é o fosfato e R é o radical comum da ornitina, citrulina, e arginina. A chamada 'OCT anabólica' atua no anabolismo da citrulina (via da síntese da arginina), onde a citrulina é o produto. Termodinamicamente, a OCT favorece a formação da citrulina, pois em um pH entre 6.7 e 7.4, com $I = 0.1 \text{ M}$ e $T = 38^\circ\text{C}$, $\Delta_r G_m = -29.8 \text{ kJ. mol}^{-1}$, dando um $K' = 10^5$ (REICHERD, 1957).

Em muitos procariontes e em alguns eucariontes, a OCT é encontrada no citoplasma. Entretanto, em eucariontes maiores, incluindo os mamíferos, a enzima é encontrada na matriz mitocondrial (TAKIGUCHI, et al., 1989; WU; MORRIS JR,

1998). Em humanos, a OCT é encontrada principalmente no fígado e na mucosa intestinal (TAKIGUCHI; MORI, 1995). Independente de sua localização, OCT possui estrutura cristalina e evoluída a partir da enzima aspartato carbamoiltransferase (ATC; número EC 2.1.3.2; HOUGHTON et al., 1984).

4.2.2 Óxido nítrico sintetase (NOS)

NOS é uma família de enzimas capazes de regular a síntese de óxido nítrico a partir da arginina. A família NOS agrupa-se em três isoformas, as quais diferem em termos de expressão e localização: nNOS (neuronal), iNOS (induzível), e eNOS (endotelial) (MORRIS, 2016). Cada isoforma possui, obviamente, diferentes funções. Expressa em neurônios específicos no sistema nervoso central, nNOS é responsável por regular a plasticidade sináptica, um processo associado a formação da memória e aprendizado (FØRSTERMANN; SESSA, 2012). O óxido nítrico formado pela nNOS regula a pressão arterial (MONCADA, 1997) e a atuação de neurotransmissores capazes de controlar processos como a peristalse, vasodilatação, e ereção peniana (BURNETT, 1995). iNOS, por sua vez são expressas em diferentes tipos celulares, sendo essenciais no combate a bactérias intracelulares, como a *parasite leishmania* (WEI et al, 1995). O óxido nítrico formado pela iNOS regula ainda processos inflamatórios (RAFIEE, et al., 2005) e atua no controle da vasodilatação e pressão arterial em certos distúrbios orgânicos severos como a sepse (WONG; BILLIAR, 1995). Por fim, eNOS, expressas na parede endotelial e capazes de produzir óxido nítrico via arginina, são reconhecidas por sua importância vasodilatadora e vasoprotetiva em seres humanos. De fato, o óxido nítrico liberado no lúmen vascular inibe a agregação e adesão de plaquetas na sua parede, protegendo, por

consequente, distúrbios orgânicos como a trombose (LI; FØRSTERMANN, 2000). O óxido nítrico formado pela eNOS, por fim, regula a expressão de genes associados ao processo de aterogênese (VANHOUTTE et al., 2016), sendo, desse modo, um importante agente antiaterosclerótico no âmbito clínico. Detalhes sobre a expressão e atuação da família de enzimas NOS em humanos, ver FØRSTERMANN e SESSA (2012).

4.2.3 Argininosuccinato sintetase (ASS)

Similarmente a OCT, a ASS é encontrada nos diferentes reinos biológicos, pois é uma enzima chave para o catabolismo da citrulina. Particularmente, a ASS é uma enzima citosólica que catalisa a reação a seguir (WU; MORRIS JR, 1998):



Onde ATP significa adenosina trifosfato e AMP adenosina monofosfato. Em termos termodinâmicos, a ASS favorece a degradação da citrulina, pois em um pH 6.91, com $I = 0.01 \text{ M}$ e $T = 25^\circ\text{C}$, $\Delta_r G_m = - 2.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, dando um $K' = 2.14$ (SCHUEGRAF, et al., 1960).

Em eucariontes maiores, incluindo os mamíferos, a ASS é quase universal; contudo, a enzima é encontrada em maiores concentrações no fígado e nos rins, e em menores concentrações no intestino (HUSSON et al, 2003). Em humanos, a expressão gênica da enzima varia conforme o tecido analisado, porém, parece ser modulada por hormônios e estado nutricional (CURIS et al., 2005). Ocupando o cromossomo 9, a enzima ASS possui estrutura cristalina com sítios de ligação para ATP, citrulina, e aspartato (LEMKE; HOWELL, 2002). Evidências cinéticas sugerem

que o ATP é o primeiro substrato a ser ligado na ASS, seguido por citrulina, e por fim, aspartato (RAUSCHEL; SEIGLE, 1983). A fixação do aspartato na enzima ativa a formação do intermediário citrulina-adenilato. Quando a reação é completa, ASS libera a argininosuccinato, seguido por pirofosfato, e por fim, AMP (RAUSCHEL e SEIGLE, 1983; GHOSE; RAUSCHEL, 1985). A reação da ASS ainda envolve o Mg^{+2} , porém, até o momento, a sua atuação ainda é incerta.

4.3 MECANISMOS DE AÇÃO DA CITRULINA

4.3.1 Transporte da citrulina

Até o presente momento, nenhum transportador específico de citrulina foi identificado (LEE; KANG, 2017). A citrulina é conduzida para dentro de células por transportadores genéricos de aminoácidos, e em certos casos, algumas células são capazes de captar ou liberar o aminoácido sem a presença de transportadores (HILDERMAN et al., 2000). Particularmente, todas as células no sistema nervoso (células da micróglia e macróglia e neurônios) possuem um sistema de transporte de citrulina (DEVÉS e BOYD, 1998), por mecanismos pouco claros, mas possivelmente associados com carreadores *L* de aminoácidos de cadeia longa, independentes de sódio (SCHMIDLIN et al., 2000). Em células aórticas endoteliais, similarmente, a citrulina independe de sódio e é absorvida pela célula através de um sistema de transporte pouco conhecido, porém claramente diferente do sistema de transporte da arginina - carreadores y^+ , incapaz de transportar citrulina (HILDERMAN et al., 2000). Opostamente, em células musculares lisas aórticas, o transporte da citrulina parece depender do sódio e ser insensível ao pH. Enterócitos, de modo similar, parecem

também depender de sódio (VADGAMA; EVERED, 1992). Nos rins, infelizmente, nenhum transportador específico de citrulina foi identificado (LEE; KANG, 2017), porém, a sua competição com aminoácidos dibásicos para o transporte, sugerido pelo acúmulo de citrulina na urina após uma adição de lisina (OYANAGI et al., 1981), denotam a sua existência.

Conforme previamente mencionado, a citrulina é sintetizada pela OCT na mitocôndria, mas é catabolizada pela ASS no citosol da célula (MORRIS 2006). Assim, um mecanismo de transporte intracelular parece existir em células capazes de expressar OCT e ASS e que realizam um ciclo de uréia parcial ou completo (PORTER, 2000). Esse mecanismo de transporte envolve um trocador citrulina-ornitina, localizado na membrana interna da mitocôndria, além de íons prótons e Ca^{+2} (POOLMAN et al., 1987).

4.3.2 Absorção, síntese, e catabolismo da citrulina

A citrulina contida no alimento é absorvida pelo intestino delgado em seres humanos, primariamente nas porções mediais e finais do íleo. Caso presente no espaço luminal, o aminoácido acumula-se nos enterócitos, sugerindo assim a ação de transportadores (VADGAMA; EVERED, 1992). Apesar disso, a citrulina não é considerada um aminoácido essencial em condições fisiológicas normais. De fato, uma maior porção da citrulina livre deriva da conversão de glutamina nos enterócitos (WU e MORRIS JR, 1998). Outros aminoácidos podem ainda atuar como precursores de citrulina, dentre eles, glutamato, prolina, e arginina (WU, 1998). A glutamina, particularmente, deriva da alimentação e da circulação sanguínea (PLAETH et al., 1999). De fato, enterócitos metabolizam ~25-33% da glutamina

arterial, 66% da glutamina luminal, e 96% do glutamato luminal (WU, 1998). Cabe salientar que a síntese da citrulina no intestino delgado é crucial, e pode ser demonstrado por seus efeitos nocivos na constipação intestinal (CRENN; CYNOBER, 2009) e no retardo ao crescimento em animais (HOOGENRAAD et al., 1985) e humanos (CASANELLO; SOBREVIA, 2002).

Caso a citrulina não seja usada no metabolismo do óxido nítrico, ela é metabolizada nos rins, sendo convertida em arginina nas células dos túbulos proximais dos néfrons (LEVILLAIN et al, 1990). A conversão nos rins ocorre através de um ciclo da uréia parcial, com a presença das enzimas ASS e argininosuccinato liase (ASL; número EC 4.3.2.1), e a arginina sintetizada via citrulina é liberada na circulação sanguínea, em quantidade suficiente para se atingir as necessidades diárias de arginina em adultos. Próximo de 60% da síntese *de novo* de arginina nos seres humanos ocorre pela conversão renal da arginina via citrulina (MORRIS, 2016). Ainda, cerca de 83% da citrulina liberada pelo intestino é metabolizada nos rins, representando apenas 35% da citrulina circulante (MORRIS, 2006).

A maior razão para a divisão de tarefas entre dois órgãos no metabolismo da citrulina parece estar associada com a capacidade de captura de arginina pelo fígado. De fato, grande parte da arginina fornecida pela alimentação seria removida pela circulação porta hepática, deixando uma quantidade reduzida do aminoácido para outros órgãos, caso não houvesse a participação da citrulina no processo. Atuando como uma forma oculta de arginina, a citrulina ultrapassa o fígado, pois o tecido hepático é incapaz de capturar o aminoácido na circulação porta (WINDMUELLER; SPAETH, 1981). A citrulina, então, é convertida em arginina pelos

rins e liberada na circulação sanguínea (MORRIS, 2016), atuando de modo singular nos diferentes tecidos corporais. Cabe salientar, por fim, alguns poucos detalhes a respeito das propriedades farmacocinéticas da citrulina.

Até recentemente, a disponibilidade do aminoácido no organismo humano era pouco conhecida; entretanto, dois estudos (SCHWEDHELM et al., 2007; MOINARD et al., 2008) revelaram que a ingestão oral de doses diferentes de citrulina (2-15 g.dia⁻¹) foi capaz de aumentar a concentração plasmática de arginina, com valores pico do aminoácido ocorrendo 1.1 - 2.2 h pós-ingestão. Doses maiores de citrulina causaram um aumento na concentração plasmática de citrulina, possivelmente gerado pela saturação renal da conversão do aminoácido para arginina (MOINARD et al., 2008).

4.4 SUPLEMENTAÇÃO DE CITRULINA COMO AGENTE TERAPÊUTICO

Conforme mencionado anteriormente, o metabolismo da citrulina depende da ação de três enzimas chave: OCT, NOS, e ASS. Ainda, o trocador citrulina-ornitina, localizado na membrana da mitocôndria, têm papel importante no metabolismo do aminoácido. Assim, mutações gênicas, não letais, destas proteínas causarão doenças hereditárias associadas a uma deficiência no seu metabolismo, aumentando a vulnerabilidade do organismo para uma disfunção no ciclo de uréia, seguido de acúmulo exacerbado de amônia, coma, e morte (CURIS et al., 2005). De fato, perda da funcionalidade de OCT evita a produção de citrulina, causando, por conseguinte, aumentos na concentração plasmática de glutamina – precursor natural da citrulina-, lisina, e serina. No sangue, a concentração de citrulina será escassa, pois a citrulina não pode ser sintetizada no intestino delgado. Assim, a deficiência

de OCT, rara (1 para 80 000 nascimentos) e associada com o cromossomo X, ocorrerá, causando efeitos deletérios no organismo (LICHTER-KONECKI et al., 2013). A perda da funcionalidade da ASS causa, por sua vez, uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de citrulina no corpo, ocasionada por problemas associados ao catabolismo do aminoácido. Assim, a citrulinemia, rara (1 para 100 000 nascimentos) é mais comum em povos orientais, caracteriza-se ainda pelo acúmulo de ácido orótico, glutamina, e alanina, e pela diminuição de arginina no sangue (QUINONEZ; THOENE, 2004). Por fim, a perda da funcionalidade do trocador citrulina-ornitina causa uma doença caracterizada por um aumento nas concentrações plasmáticas de ornitina e amônia e presença de homocitrulina na urina. A disfunção, chamada síndrome do triplo H – hiperornitinemia, hiperamoniemia, e homocitrulinúria, é perigosa ao organismo humano pois causa o aumento da concentração de amônia no sangue, seguido de coma, e ultimamente, morte (MARTINELLI et al., 2015).

A periculosidade das doenças hereditárias associadas a deficiência no metabolismo da citrulina mostraram a sua importância para a sobrevivência humana (KOBAYASHI et al., 1999). Neste contexto, verificou-se um maior interesse da comunidade científica e clínica nas últimas décadas no estudo – e uso - da citrulina como um potencial agente terapêutico (BAHRI et al., 2013; ROMERO et al., 2006). De fato, conforme mencionado anteriormente, a citrulina atua como uma forma oculta de arginina, ultrapassando o fígado, pois hepatócitos são incapazes de capturar o aminoácido na circulação porta (WINDMUELLER; SPAETH 1981). A citrulina, então, é convertida em arginina pelos rins e liberada na circulação sanguínea, atuando de modo variado no organismo (MORRIS JR 2016).

Opostamente a citrulina, a arginina é capturada e amplamente metabolizada no fígado, gerando, por conseguinte, uréia, e suscitando ressalvas médicas referentes ao seu uso no contexto clínico (GRIMBLE et al., 2007).

Um exemplo de uso terapêutico da citrulina refere-se a constipação intestinal severa, uma condição patológica onde o principal sítio de produção de citrulina faz-se inócuo (CRENN; CYNOBER, 2010). Uma consequência óbvia da reduzida produção de citrulina no intestino delgado é o decréscimo da arginina no plasma, tornando o aminoácido, por conseguinte, essencial (CRENN et al., 2000). Neste sentido, torna-se inequívoca a especulação que a suplementação de citrulina causaria um aumento na concentração de arginina no plasma, seguido de uma melhora no estado nutricional do paciente com constipação intestinal severa (CRENN; CYNOBER, 2010). Tal hipótese foi comprovada por estudos anteriores de OSOWSKA, et al. (2004, 2008), revelando que uma nutrição enteral rica em citrulina ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) foi capaz de promover a síntese de arginina em diversos tecidos e restaurar o balanço nitrogenado em modelos animais.

Outro exemplo de uso terapêutico da citrulina refere-se a perda involuntária da massa muscular ocorrida com o avanço da idade, um processo denominado de sarcopenia (ROUBENOFF; HUGHES, 2000). De modo prático, a sarcopenia – *pobreza de músculos*, termo grego cunhado pioneiramente por ROSENBERG (1989), aumenta o risco de queda acidental e incapacidade funcional no idoso, tornando-o, por conseguinte, predisposto a doenças associadas a inatividade física e a mortalidade prematura (SUZUKI et al., 1994; BROWN et al., 2016). Embora enormemente complexa, a sarcopenia pode estar relacionada com um decréscimo

na capacidade de síntese proteica após alimentação na população idosa (CASTANEDA et al., 1995). De fato, um aumento no metabolismo de aminoácidos na área esplênica ocorre de modo substancial em idosos (BOIRIE et al., 1997), revelando maior extração esplênica e níveis inadequados de aminoácidos no plasma no período pós-prandial (MOSONI et al., 1995). Concentrações reduzidas de aminoácidos no plasma no período pós-prandial, obviamente, impedem aumentos na síntese proteica (BOHE et al., 2003), exacerbando, assim, o processo de sarcopenia na população idosa. Portanto, poderia-se especular que a suplementação de citrulina, um aminoácido incapaz de ser capturado na área esplênica, causaria um aumento na disponibilidade de nitrogênio aos tecidos periféricos, incluindo músculos esqueléticos, aumentando, por conseguinte, a síntese proteica em idosos. Um estudo recente por JOURDAN et al., (2015) comprovou tal hipótese, demonstrando que a suplementação aguda de citrulina foi capaz de promover síntese proteica em humanos.

A suplementação de citrulina promove ainda efeitos terapêuticos como um aminoácido precursor da arginina para o ciclo do óxido nítrico (PASTOR et al., 1995). A citrulina, de fato, é facilmente convertida em arginina pelo ciclo da uréia parcial via atividade das enzimas ASL e ASS, formando-se, assim, o precursor do óxido nítrico. Logo, células capazes de produzir óxido nítrico a partir da arginina são também capazes de capturar citrulina na circulação sanguínea, explicando as razões as quais o aminoácido induz, indiretamente, a certos efeitos do óxido nítrico, como a reduzida tonicidade vascular (VANHOUTTE et al., 2016). De fato, evidências sugerem que a pressão arterial pode ser modificada após suplementação de citrulina (FIGUEROA et al., 2017). Decréscimos na pressão arterial sistólica e diastólica

braquial (~7/3 mmHg) e aórtica (~9/3 mmHg) são observados após 8 semanas de suplementação de citrulina (6 g . dia⁻¹) em mulheres obesas, pré-hipertensas e hipertensas (WONG et al., 2016). Similarmente, houveram decréscimos na pressão arterial sistólica e diástólica braquial em pacientes portadores de distúrbios coronarianos após 8 semanas de suplementação com citrulina (OROZCO-GUTIERREZ et al., 2010). Embora efeitos hipotensores após suplementação crônica de citrulina foram evidenciados em populações com distúrbios coronarianos e vasculares, certa contradição parece existir a respeito de seus efeitos em adultos normotensivos. De fato, em um estudo recente, ALSOP e HAUTON (2016) demonstraram reduções na pressão arterial sistólica e diástólica braquial (~7/11 mmHg) em adultos normotensivos após 7 dias de suplementação de citrulina (3 g . dia⁻¹). Opostamente, a suplementação de citrulina (5.8 g . dia⁻¹) por 7 dias causou nenhum efeito na pressão arterial sistólica e diástólica braquial em homens normotensivos de meia-idade (OCHIAI et al., 2012). Tais resultados foram corroborados por outros estudos (FIGUEROA et al., 2010, 2016), reforçando, assim, o papel da citrulina como um agente terapêutico – e não preventivo – na regulação da tonicidade vascular (VANHOUTTE et al., 2016; FIGUEROA et al., 2017). Cabe salientar, por fim, que a suplementação de citrulina pode atuar como um agente terapêutico em outros distúrbios, incluindo a hiperamonemia transitória e permanente, onde a citrulina combate o excesso neurotóxico de amônia na circulação sanguínea, indiretamente, como um precursor da arginina (CALLIS et al., 1991).

4.5 SUPLEMENTAÇÃO DE CITRULINA COMO AGENTE ERGOGÊNICO

Nos últimos anos, verificou-se um maior interesse da comunidade científica e clínica no estudo – e uso - da citrulina como um potencial agente ergogênico no contexto do exercício físico (BÉSCOS et al., 2012; FIGUEROA et al., 2017). De fato, a citrulina, pura ou combinado com outro aminoácido, malato, um intermediário do ciclo tricarboxílico capaz de oxidar nutrientes para formar ATP, pode melhorar a capacidade para realizar exercício físico em humanos (BENDAHAN et al., 2002). Contudo, para atender o escopo da presente revisão de literatura e isolar os potenciais efeitos ergogênicos do malato per se, ênfase será dada aos estudos que examinaram os efeitos da suplementação aguda e crônica de citrulina pura - e sua associação com o desempenho físico-, em populações diversas.

4.5.1 Suplementação aguda de citrulina e desempenho físico

A suplementação de citrulina pode otimizar o desempenho físico em humanos através, primariamente, de dois mecanismos de ação. Primeiro, as principais fontes de citrulina plasmática são, nomeadamente, arginina e glutamina, as quais são catabolizadas nos intestinos (BREUILLARD et al., 2015), e a ingestão exógena de citrulina nos alimentos (MOINARD et al., 2008). Após a produção de arginina através da citrulina nos rins, parte da arginina *de novo* é liberada na circulação sanguínea. Assim, a suplementação oral de citrulina aumenta a disponibilidade de arginina no plasma como um substrato para a formação do óxido nítrico, o qual, por sua vez, regula numerosos efeitos fisiológicos no organismo humano, como tonicidade vascular, contratilidade muscular, respiração mitocondrial, homeostase de cálcio e da glicose, dentre outros (STAMLER et al., 2001). Segundo, a uréia é essencial para a eliminação de nitrogênio (amônia) no fígado. No ciclo da uréia, a arginina

produzida através da citrulina é catabolizada pela arginase (ARG, número EC 3.5.3.1) em dois compostos, ornitina e uréia. A suplementação de citrulina parece aumentar a homeostase da amônia (BREUILLARD et al, 2015), causando, por conseguinte, um decréscimo na concentração de amônia na circulação sanguínea, um composto comumente associado com a fadiga muscular periférica – ocasionado por sua aumentada ativação da glicólise anaeróbica e produção de ácido láctico (SPRIET; HARGREAVES, 2006; ALLEN et al., 2008).

De modo surpreendente, a suplementação aguda de citrulina parece ter pouco efeito ergogênico na capacidade para realizar exercício físico em humanos. De fato, em um estudo recente, CUTRUFELLO et al (2015) demonstraram que a ingestão aguda de citrulina (6 g) 1 - 2 horas antes de um teste de exercício físico com cargas incrementais pouco afetou o consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$) e o tempo até a exaustão em adultos jovens, saudáveis. Não obstante, verificou-se ainda nenhum efeito ergogênico agudo da citrulina no limiar anaeróbico, sugerindo, assim, que o fornecimento de ATP para a demanda da musculatura ativa via glicólise anaeróbica pouco modificou-se, apesar do especulado decréscimo na concentração de amônia no sangue (BREUILLARD et al, 2015).

Tais achados confirmam estudos anteriores, realizados em adultos jovens, saudáveis (TARAZONA-DIAZ, et al., 2013) ou idosos (CHURCHWARD-VENNE et al., 2014; KIM et al., 2015), e reforçam a incapacidade da suplementação aguda de citrulina para melhorar a capacidade de realizar exercício físico em humanos, independentemente da maior síntese *de novo* da arginina (MORRIS JR., 2016). Cabe salientar, contudo, que os poucos estudos supracitados possuem limitações,

incluindo a ingestão de uma dose genérica, não baseada em evidências, da substância ($< 6 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$; ver MOINARD, et al., 2008).

4.5.2 Suplementação crônica de citrulina e desempenho físico

A suplementação crônica de citrulina, opostamente, parece melhorar a capacidade de realizar exercício físico em humanos (FIGUEROA et al., 2017). De fato, em um estudo recente, BAILEY et al. (2015) examinaram os efeitos de 7 – 16 dias de suplementação de citrulina sobre o $\dot{V}O_2$ e desoxigenação muscular durante exercício físico moderado e vigoroso em homens adultos, ativos. Os autores notaram que o $\dot{V}O_2$ permaneceu inalterado durante exercício físico moderado e vigoroso, corroborando, assim, estudos anteriores, como SUZUKI et al. (2016), os quais demonstraram nenhum efeito no $\dot{V}O_2$ durante exercício físico com carga constante (4-km *time trial*) após suplementação de citrulina ($2.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$) por 7 dias. Os autores notaram, todavia, padrões diferenciados na desoxigenação muscular, medida por espectroscopia por infravermelho proximal. Concentrações menores de hemoglobina/mioglobina desoxigenada e taxas maiores de saturação de oxigênio tecidual foram reportadas durante exercício físico moderado e vigoroso (BAILEY et al., 2015). Tais achados foram recentemente confirmados por BAILEY et al. (2016). Usando uma amostra composta por adultos jovens, porém ativos, os autores notaram um aumento nas concentrações plasmáticas de citrulina, arginina, e nitrato após 14 – 16 dias de suplementação com suco concentrado de melância ($3.4 \text{ g} \cdot \text{dia}^{-1}$). Os autores notaram ainda taxas maiores de saturação de oxigênio tecidual foram reportadas durante exercício físico moderado e vigoroso, contudo, sem nenhum efeito no tempo até a exaustão durante exercício físico severo (BAILEY

et al., 2016). Os estudos citados acima, portanto, sugerem potenciais efeitos ergogênicos da suplementação crônica de citrulina no desempenho físico em humanos. Cabe notar novamente que os poucos estudos possuem limitações inerentes, incluindo o período e a dosagem genérica usada para a suplementação (MOINARD et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO 1 – Effects of *L*-citrulline supplementation on exercise performance in humans: A dose-response study

1. Manuscrito científico a ser submetido para publicação no periódico European Journal of Nutrition.

Resumo

A citrulina ($C_6H_{13}N_3O_3$), aminoácido não protéico e neutro, têm despertado o interesse da comunidade clínica e acadêmica, devido aos seus potenciais efeitos de importância biológica no âmbito da saúde e do esporte. Contudo, pouco ainda é conhecido se tais efeitos são de caráter dose-dependente. Desse modo, o presente estudo investigou os efeitos de diferentes doses da suplementação oral e aguda de *L*-citrulina sobre a capacidade para realizar exercício físico – e suas respostas fisiológicas associadas - em adultos jovens. Doze homens, moderadamente treinados, com idades entre 18 e 30 anos, realizaram seis testes de exercício físico incremental do tipo rampa em ciclo ergômetro até exaustão, com um intervalo de 7 dias entre testes. Em cada ocasião, os participantes ingeriram 6 g de *L*-citrulina pura, 12 g de *L*-citrulina pura, ou placebo ~ 90 min antes do começo do teste. Parâmetros bioquímicos ([*L*-citrulina] plasmática), fisiológicos ($\dot{V}O_{2max}$, GET, e ([lactato] plasmático) e de performance (W_{max} e tempo até a exaustão) foram determinados. Basicamente, os achados do presente estudo demonstraram que a suplementação oral aguda de *L*-citrulina parece exercer poucos efeitos na capacidade para realizar exercício físico – e suas respostas fisiológicas associadas – em adultos jovens, independente da dose administrada, apesar de seus efeitos dose-dependente na ([*L*-

citrulina] plasmática.

5.1.1 Introdução

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous, water-soluble, gaseous signalling molecule that plays a crucial role in a myriad of physiological functions including vascular tone, cellular calcium handling, skeletal muscle glucose uptake, neurotransmission, mitochondrial respiration and skeletal muscle contractility (STAMLER; MEISSNER 2001). NO can be generated through the oxidation of the amino acid *L*-arginine, in a process catalyzed by the NO synthase (NOS) enzymes (FØRSTERMANN; SESSA, 2012). Alternatively, NO can be generated via the one electron reduction of nitrite (NO_2^-), a process that may be of importance in situations where oxygen (O_2) availability is low, and/or NOS function is impaired (DEJAM et al., 2004; ØSTERGAARD et al., 2007). The co-existence of these two complementary NO-generating pathways facilitates NO synthesis across a diverse range of physiological conditions.

It is well established that dietary supplementation with inorganic nitrate (NO_3^-), which undergoes a stepwise reduction to nitrite (NO_2^-) and then NO (LUNDBERG et al., 2008), can increase NO biomarkers, reduce blood pressure and the O_2 cost of exercise and enhance exercise performance in healthy adults (BAILEY et al. 2009; KELLY et al., 2013; LARSEN et al., 2010; VANHATALO et al., 2010). Some studies have also reported increased NO biomarkers and enhanced exercise economy and exercise tolerance following dietary supplementation with the NOS substrate, *L*-arginine (BAILEY, et al., 2010; BUFORD; KOCH, 2004; STEVENS, et al., 2000). Some other studies, however, have not identified any significant effects of *L*-arginine

on exercise economy or exercise tolerance (BESCÓS et al., 2009; KOPPO et al., 2009; VANHATALO et al., 2013). These conflicting findings may be related to differences in dose, timing and duration of supplementation (ALVARES et al., 2011). The discrepancies between findings might also be related, at least in part, to significant pre-systemic (CASTILLO et al., 1993) and systemic (O'SULLIVAN et al., 1998) elimination process of orally ingested *L*-arginine. Breakdown of *L*-arginine by intestinal bacteria and arginase enzymes on the first pass (CASTILLO et al., 1993), systemic extraction and catabolism by the liver (YU et al., 1996; O'SULLIVAN et al., 1998), and competition with asymmetric dimethylarginine and other *L*-arginine analogs for the transporter y^+ carrier (CLOSS et al., 1997) are some of the mechanisms involved in the down regulation of ingested oral *L*-arginine. It is therefore difficult to suggest oral *L*-arginine supplementation as an attractive method to stimulate NO synthesis through the NOS pathway and improve exercise performance in humans.

Differently from *L*-arginine, *L*-citrulline, a nonprotein amino acid that is coproduced with NO as an end product of NOS activity, is not metabolized in the intestine or liver (MORRIS Jr et al., 2016) and has been reported to increase argininemia (KUHN et al., 2002) and NO synthesis (WIJNANDS et al., 2012) more effectively than *L*-arginine. It has also been reported that *L*-citrulline supplementation can increase the activity of NOS (WIJNANDS et al., 2012) and increase NO biomarkers (SCHWELDHHELM et al., 2008), and there is a growing body of evidence showing that short term supplementation with *L*-citrulline can improve skeletal muscle metabolism and/or contractile efficiency (BAILEY et al., 2015; GIANNESINI et al., 2011; BENDAHAN et al., 2002) and enhance fatigue resistance (BAILEY et al., 2015,

2016). Therefore, exogenous *L*-citrulline administration might represent an attractive alternative to increase the amount of *L*-arginine provided to NOS and to improve exercise efficiency and exercise performance. However, since all exercise performance studies completed to date with *L*-citrulline have administered doses < 6 g, it is unclear whether a greater dose of *L*-citrulline might further affect physiological responses to exercise and exercise performance in healthy adults. The establishment of the optimal *L*-citrulline dose for enhancing exercise performance is of importance given the increasing popularity of *L*-citrulline supplementation in both basic research and applied exercise settings (BESCÓS et al., 2012).

Accordingly, the purpose of the present study was to examine whether oral ingestion of two different doses of *L*-citrulline would enhance plasma *L*-arginine and *L*-arginine availability as well as affect physiological responses to exercise and improve exercise performance, compared with energy-matched placebo. It was hypothesized that the effects of acute *L*-citrulline supplementation on plasma *L*-arginine concentration and availability, physiological responses to exercise, and exercise performance would be dose dependent (MOINARD et al., 2008).

5.1.2 Materiais e Métodos

Subjects

Twelve male adults between 18 and 30 yr of age were recruited to participate in this study. A detailed written explanation of the experimental protocol was given to all subjects before they be tested. None of them should smoke tobacco and use dietary

supplementation or take any medication that could affect their cardiorespiratory or metabolic responses to exercise. In the 24 h preceding the first exercise test, they recorded their food intake, and this diet was replicated in the 24 h preceding subsequent tests (please see Nutrient Intake section). Additionally, they were instructed to arrive at the laboratory in a rested and fully hydrated state, ≥ 3 h postprandial, and to refrain from caffeine and alcohol intake 6 and 24 h before each test, respectively. Subjects were asked to avoid strenuous exercise in the 24 h preceding each testing session. Finally, they were required to be in good health and none of them could have medical contraindications for participation in the study. All invited subjects had previously been involved in cycle ergometer studies at this intensity in similar conditions, and are fully familiar with the study procedures. All study procedures were submitted for approval by the Institutional Ethics Committee.

Experimental Overview

All subjects were required to report to the laboratory on seven separate occasions over a period of 6 wk. Upon arrival to the laboratory, subjects rested for 10 min in a seated position. After the rest period, the blood pressure was measured. Subjects were then randomly assigned to ingest 6 g of pure *L*-citrulline, 12 g of pure *L*-citrulline, or energy-matched placebo (see Supplementation protocol section) ~90 min prior to exercise. This approach is based on the findings of MOINARD et al (2008) who reported that 2 - 15 g \cdot day⁻¹ of oral *L*-citrulline elevated plasma *L*-arginine concentration with the peak values being maintained between 70 to 140 min post-ingestion. After the 90 min rest period, a replicated blood pressure measurement was taken. Subjects then performed a ramp incremental exercise

test to the limit of tolerance on an electromagnetically braked cycle ergometer. In each ramp exercise protocol, the work rate was increased linearly and continuously with a rate of $35 \text{ W} \cdot \text{min}^{-1}$ ($\sim 0.58 \text{ W min}^{-1}$). Previous studies (BOONE et al, 2009; 2010) have shown that this ramp slope would lead to exhaustion in ~ 12 min in a group of moderately trained adults. The actual ramp increase in work rate was preceded by 3 min of rest on the cycle ergometer and by 3 min of baseline cycling at 40 W. The baseline value of 40 W was used to ensure that possible changes in mechanical efficiency at very low work rates would not interfere with the linear increase in $\dot{V}O_2$ (BOONE et al, 2008). The test was terminated when the subject could no longer maintain the instructed pedal rate (75 rpm). The instantaneous pedal rate was continuously visualized on a display connected to the cycle ergometer, so that the subject were fully informed about the cadence throughout the exercise tests. All subjects were asked to arrive in the laboratory in the morning (between 06:00 and 12:00 a.m.) and all exercise tests were performed at the same time (± 2 h) of the day to avoid circadian variance. Of note, all tests were replicated twice by all subjects in each supplement condition (pooled data).

Supplement Protocol

Subjects were randomly assigned to receive either 6 g of pure *L*-citrulline (Arboretum; administered with 0.5 L of water), 12 g of pure *L*-citrulline, or energy-matched placebo (starch) gelatinous capsules in a double-blind, crossover design, with a 7 d washout period between the two conditions. A 7 d washout period is enough because the elimination half-life of a single oral dose of 6 g of *L*-arginine is ~ 24 h (SCHWEDHELM et al., 2012). Placebo capsules were at the same size, color, and

flavor as the *L*-citrulline capsules.

Nutrient Intake

Subjects were instructed to record their food intake for 24 h before the first exercise test and were asked to replicate the same diet before subsequent tests. Under the supervision of nutritionists, they were advised to follow a diet rich in carbohydrate ($> 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) body weight, which, in combination with light training or rest, would allow subjects to start the tests with adequate glycogen stores (PFEIFFER et al, 2010). Diet was assessed with 24 h recalls the days before the tests, and carbohydrate intake of all subjects was confirmed to be - or not to be - $> 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight. The participants were also instructed to report in the dietary records any adverse events from the dietary supplementation with *L*-arginine or placebo on their health status.

Gas exchange and heart rate measurements

During all exercise tests, pulmonary gas exchange and ventilation were measured continuously on a breath-by-breath basis by means of a portable gas analysis system (K4b₂, Cosmed srl, Rome, Italy). A turbine digital transducer measured inspired and expired airflow; otherwise, an electrochemical cell O₂ analyser and infrared CO₂ analyser simultaneously measured expired gases using a capillary line connected to a mouthpiece. The analyser was calibrated before each test with gases of known concentration, and turbine volume transducer was calibrated using a 3 L syringe

(Hans Rudolph, Kansas City, MO). The analyser was previously validated for measuring gas exchanges over a wide range of exercise intensities (MCLAUGHLIN et al, 2001). Heart rate was recorded by means of the K4b₂ system from a chest belt transmission (Polar Electro, Kempele, Finland).

Data Analysis

$\dot{V}O_2$ max was defined as the highest 10 s mean value attained before the subject's volitional exhaustion in the test (BAILEY et al, 2010). The gas exchange threshold (GET) was defined as the point at which $\dot{V}CO_2$ production ($\dot{V}CO_2$) began to increase out of proportion in relation to $\dot{V}O_2$ with a systematic rise in minute ventilation (\dot{V}_E)-to- $\dot{V}O_2$ ratio and end tidal $\dot{V}O_2$ max PO_2 , whereas \dot{V}_E -to- $\dot{V}O_2$ ratio and end tidal PCO_2 is stable (BEAVER et al., 1981). Both $\dot{V}O_2$ max and GET were described as a function of body mass. Maximal power output (W_{max}) was determined by the following formula: $W_{max} = W_{out} + [(t/60)35]$, where W_{out} is the power output (W) during the last completed stage and t is the time (s) in the final stage (PFEIFFER et al, 2010). The slope of the time averaged $\dot{V}O_2$ to work rate profiles for ramp exercise test [reflecting the functional $\dot{V}O_2$ gain ($\Delta\dot{V}O_2/\Delta W$)] was determined using linear regression analysis ($y = ax + b$) (BOONE et al, 2012).

Statistical Analysis

The mean values \pm SD were analysed for time of exhaustion, $\dot{V}O_2$ max, GET, W_{max} , and functional $\dot{V}O_2$ gain in each supplementation condition and these parameters were further compared using one-way ANOVA. Significance was set at $P < 0.05$.

5.1.3 Resultados

Acute ingestion of different doses of *L*-citrulline was tolerated well by all participants. None of them reported any negative side effects, consistent with previous studies (BAILEY et al., 2015; GIANNESINI et al., 2011; BENDAHAN et al., 2002).

The effects of different doses of *L*-citrulline on plasma [*L*-arginine] are shown in Fig. 1. There were significant main effects by dose and time and an interaction effect for plasma [*L*-arginine] ($P < 0.05$). At resting baseline, before the ingestion of *L*-citrulline, plasma [*L*-arginine] was not significantly different between doses ($P < 0.05$). ANOVA analyses shown significant dose-dependent increases in plasma [*L*-arginine] following acute *L*-citrulline supplementation ($P < 0.05$).

*** Insert Figure 1 ***

The ramp exercise protocol lasted, on average, 847 ± 16 sec and 856 ± 21 sec in both 6 g and 12 g *L*-citrulline supplementation conditions, whereas the ramp protocol lasted 856 ± 17 sec in placebo condition (Fig. 2A). As unexpected, participants reached a similar W_{max} in both 6 g and 12 g *L*-citrulline supplementation conditions ($312.2W \pm 10$ and $316.6W \pm 14$) compared with placebo condition ($313.3W \pm 10$) (Fig. 2B, $P > 0.05$).

*** Insert Figure 2 ***

$\dot{V}O_2$ max did not differ significantly between the three conditions (49.6 ± 2.6 , 49.2 ± 4.1 , and 50.1 ± 3.2 mL.kg⁻¹.min⁻¹ for both 6 g and 12 g *L*-citrulline supplementation and placebo conditions, respectively). The GET, determined during the ramp exercise test, occurred on average at a same intensity for both *L*-citrulline supplementation and placebo conditions, respectively ($P > 0.05$). There were no between-group difference in the blood [lactate] at any time point in the *L*-citrulline supplementation and placebo conditions ($P > 0.05$; Figure 3).

*** Insert Figure 3 ***

Fig. 4 shown the relationship between changes (Δ) in plasma [*L*-arginine] following *L*-citrulline supplementation and placebo and maximal power output (W_{max} ; W) and time to exhaustion (TTF; sec). As expected, there were a significant association between relationship between Δ in plasma [*L*-arginine] and both maximal power output (W_{max} ; W) and time to exhaustion (TTF; sec) ($P < 0.05$).

*** Insert Figure 4 ***

5.1.4 Discussão

To the authors' knowledge, this is the first investigation that examined the acute effects of different oral doses of *L*-citrulline on plasma *L*-arginine

and *L*-arginine availability, physiological responses to exercise and exercise performance, compared with energy-matched placebo, in a group of moderately trained young adults. Previous studies have focused on administered doses of *L*-citrulline < 6 g, which might not be enough to affect physiological responses to exercise and exercise performance in humans (BAILEY et al., 2015; GIANNESINI et al., 2011; BENDAHAN et al., 2002), and little is known about the effects of greater doses in this condition. The establishment of the optimal *L*-citrulline dose for enhancing exercise performance is of importance given the increasing popularity of *L*-citrulline supplementation in both basic research and applied exercise settings (BESCÓS et al., 2012).

The main findings of this study were that plasma [*L*-arginine] and plasma [*L*-arginine] availability increased dose dependently up to ~110.0 mmol . mL⁻¹. Dose-dependent effects of *L*-citrulline were not enough to elicit any significant impact in the exercise performance to ramp, incremental exercise test on a cycle ergometer, although there were a significant correlation between Δ in plasma [*L*-arginine], maximal power output and time to exhaustion, both broadly used as indicators of exercise performance. Dose-dependent effects of *L*-citrulline were also not sufficient to elicit any influence on physiological responses to submaximal or maximal exercise. These findings reinforce that acute supplementation with *L*-citrulline does not modify physiological responses or improve exercise tolerance during a non-steady-state, incremental ramp exercise in moderately trained young adults.

The results of Figure 1 demonstrated that acute supplementation of *L*-citrulline causes dose-dependent increases in plasma [*L*-arginine]. Plasma [*L*-arginine]

increased by up to $\sim 110.0 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ by approximately 1.5 h after the ingestion of 12 g of *L*-citrulline.

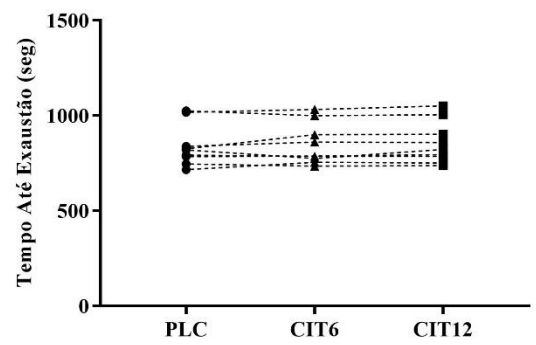
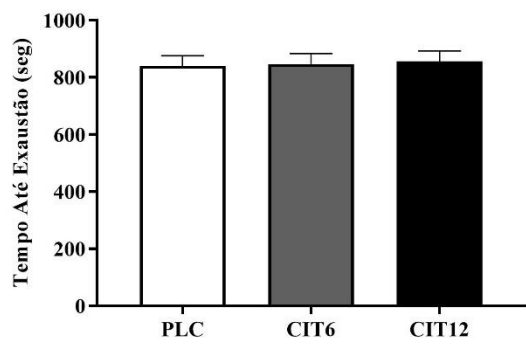
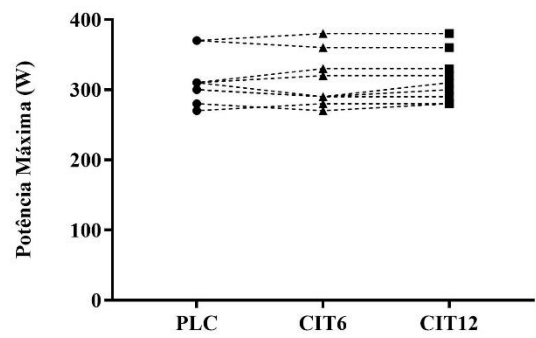
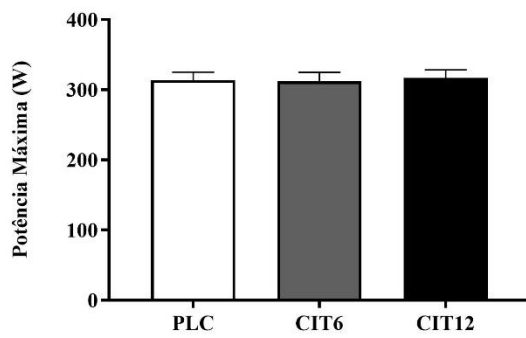
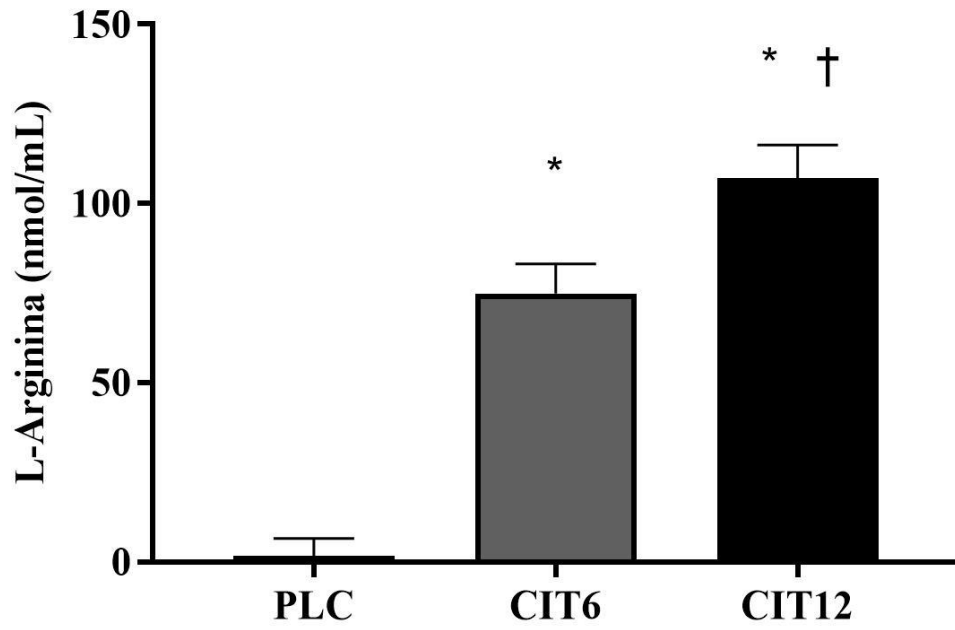
These findings emphasize that differently from *L*-arginine, *L*-citrulline, a nonprotein amino acid that is coproduced with NO as an end product of NOS activity, is not metabolized in the intestine or liver (MORRIS Jr et al., 2016) and has been reported to increase argininemia (KUHN et al., 2002) and NO synthesis (WIJNANDS et al., 2012) more effectively than *L*-arginine itself. These changes in plasma [*L*-arginine] responses may have a clear, substantial impact on exercise performance. In fact, there is a body of evidence showing that short term supplementation with *L*-citrulline improved skeletal muscle metabolism and/or contractile efficiency (BAILEY et al., 2015; GIANNESINI et al., 2011; BENDAHAN et al., 2002) and enhanced fatigue resistance (BAILEY et al., 2015, 2016). In the current study, supplementation with different doses of *L*-citrulline did not result in significant effects on exercise performance to incremental exercise test on a cycle ergometer. However, significant correlation was found between Δ in plasma [*L*-arginine], maximal power output and time to exhaustion, which might suggest both that Δ in plasma [*L*-arginine] are needed to cause Δ in exercise performance following an acute supplementation with *L*-citrulline, regardless of administered dose, and that there were responders and non-responders to the substance (Figs. 2 and Fig. 4). Both speculations, however, should be further examined in future studies.

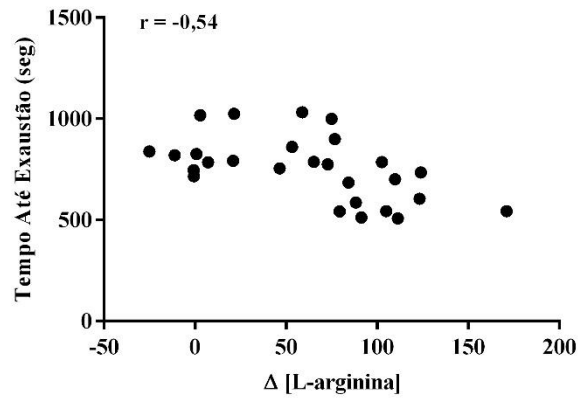
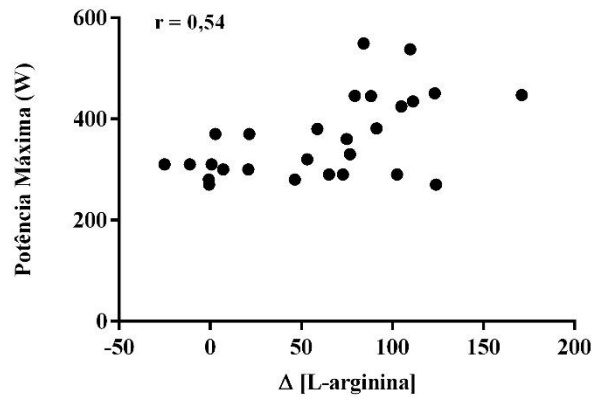
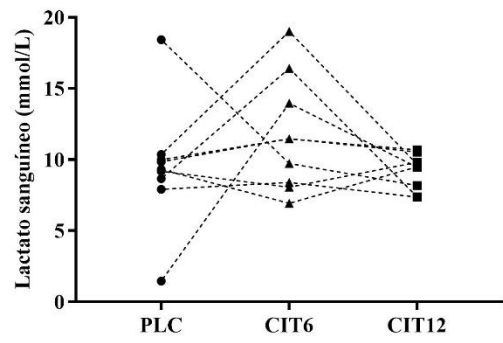
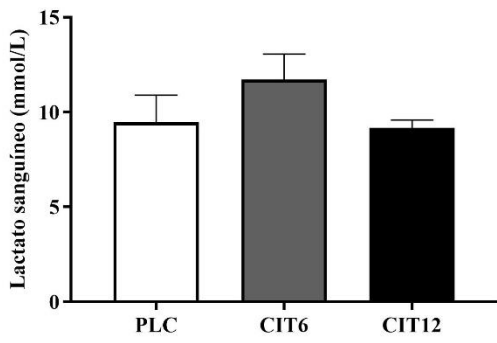
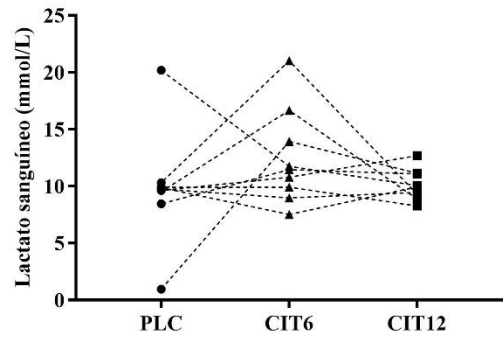
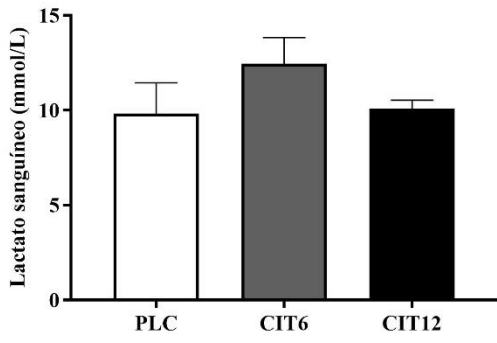
As previously mentioned, supplementation with *L*-citrulline did not elicit any significant changes in physiological responses to exercise. Both $\dot{V}O_{2\text{max}}$ and GET did not differ significantly between the conditions. There were also no between-group difference in the blood [lactate] at any time point in the *L*-citrulline supplementation

and placebo conditions ($P > 0.05$; Figure 3). Therefore, it can be hypothesized that any potential change in exercise performance might be related, at least in part, to skeletal muscle metabolism and/or contractile efficiency more than central factors, reflected by changes in gas exchange parameters. These results are in line with previous studies using short term supplementation with *L*-citrulline (BAILEY, et al., 2015) or watermelon juice, a beverage rich in *L*-citrulline (BAILEY, et al., 2015).

5.1.5 Conclusão

In summary, the present study shown that acute supplementation with *L*-citrulline does not modify physiological responses or improve exercise tolerance during a non-steady-state, incremental ramp exercise in moderately trained young adults. Contrary to our hypothesis, these responses were poorly influenced by different doses of the acute supplementation with *L*-citrulline. However, it should be noted that W_{max} and time to fatigue were significantly correlated with Δ in plasma [*L*-arginine], thus suggesting a potential indirect role of plasma [*L*-arginine] availability on exercise performance in humans. From a practical standpoint, the findings from this study reinforced the role of *L*-citrulline supplementation as a poorly effective dietary intervention for improving exercise performance in moderately trained young adults.





5.2 ESTUDO 2 – Effects of acute *L*-citrulline supplementation on adjustments of pulmonary O₂ uptake and muscle deoxygenation during ramp incremental exercise in young adults ²

2. Manuscrito científico a ser submetido para publicação no periódico European Journal of Applied Physiology.

Resumo

A citrulina (C₆H₁₃N₃O₃), aminoácido não protéico e neutro, têm despertado o interesse da comunidade clínica e acadêmica, devido aos seus potenciais efeitos de importância biológica no âmbito da saúde e do esporte. Contudo, pouco ainda é conhecido se tais efeitos são de caráter dose-dependente e podem otimizar processos orgânicos como a disponibilidade e utilização de oxigênio na microcirculação muscular. Desse modo, usando a técnica de espectroscopia por infra-vermelho proximal (NIRS), o presente estudo investigou os efeitos de diferentes doses da suplementação aguda oral de *L*-citrulina sobre a relação entre disponibilidade (\dot{Q}_m) e utilização de de oxigênio ($\dot{V}O_{2m}$) em adultos jovens. Doze homens, moderadamente treinados, com idades entre 18 e 30 anos, realizaram seis testes de exercício físico incremental do tipo rampa em ciclo ergômetro até exaustão, com um intervalo de 7 dias entre testes. Em cada ocasião, os participantes ingeriram 6 g de *L*-citrulina pura, 12 g de *L*-citrulina pura, ou placebo ~ 90 min antes do começo do teste. Parâmetros respiratórios ($\dot{V}O_{2m}$) e de oxigenação muscular (via \dot{Q}_m e C(a-v)O₂) foram determinados. Os resultados do presente estudo demonstraram que a suplementação oral aguda de *L*-citrulina parece exercer efeitos mínimos na relação entre disponibilidade (\dot{Q}_m) e utilização de oxigênio ($\dot{V}O_{2m}$) em adultos jovens, independente da dose administrada.

5.2.1 Introdução

The study of the physiological response of humans to a ramp or step incremental exercise test to exhaustion has revealed much about both the mechanisms governing the cardiovascular adjustments with exercise and of factors of intracellular loci of metabolic regulation of oxidative phosphorylation. Although comprehensive reviews have discussed the factors controlling the dynamic adjustment of oxygen delivery and oxygen utilization during ramp or step incremental exercise test (BOONE; BOURGOIS, 2012; MURIAS et al., 2014), debate still remains about the mechanisms governing the control of both muscle microvascular blood flow (\dot{Q}_m) and muscle oxygen utilization ($\dot{V}O_{2m}$) across exercise intensities. This can predominantly be attributed, at least in part, to methodological constraints since measurements of \dot{Q}_m and/or $\dot{V}O_{2m}$ in humans are invasive and/or are typically made in larger conduit vessels in the exercising limbs, which may not reflect the dynamic changes in the capillaries, where gas exchange occurs (HARPER et al., 2006). Lately, near-infrared spectroscopy (NIRS) has been introduced as an attractive alternative that allows non-invasive registration of muscle oxygenation and hemodynamics at the level of the microcirculation. On the basis of the different absorption spectra of the near-infrared light at different wavelengths, NIRS can differentiate between the two major forms of hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb), i.e., oxy-[Hb + Mb] and deoxy-[Hb + Mb] (VAN BEEKVELT et, 2001). Deoxy-[Hb + Mb] can be considered a proxy for microvascular oxygen extraction and arteriovenous oxygen difference ($C(a-v)O_2$) (DELOREY et al, 2003), and according to the Fick equation [$C(a-v)O_2 = \dot{V}O_{2m}/\dot{Q}_m$], it can be assumed that the pattern of deoxy-[Hb + Mb] during exercise can provide insight into the relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$, especially because deoxy-[Hb + Mb] seems to be

less affected by changes in blood volume under the NIRS probe during exercise compared with oxy-[Hb + Mb] (GRASSI et al, 2003; FERREIRA et al, 2006). Therefore, NIRS can provide unique, noninvasive insight into the factors controlling the relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ during dynamic exercise that is a major determinant of the exercise capacity in both healthy subjects and patients (BOONE et al, 2012).

Previous studies have reported the occurrence of a linear steady state relationship between systemic blood flow [cardiac output (\dot{Q})] and whole body oxygen uptake ($\dot{V}O_{2m}$) during constant load exercise performed across a wide range of exercise intensities. As a consequence, when plotted as a function of work rate, the profile of fractional oxygen extraction or $C(a-v)O_2$ across the same range of exercise displays a hyperbolic pattern, since $\dot{V}O_2 = \dot{Q} \times C(a-v)O_2$ (ROWELL, 1974; PROCTOR et al, 1998; BARKER et al, 1999). If deoxy-[Hb + Mb] is proportional to fractional oxygen extraction or $C(a-v)O_2$, a similar hyperbolic pattern would be expected for deoxy-[Hb + Mb] as a function of work rate (DELOREY et al, 2003; FERREIRA et al, 2005). Several studies, however, demonstrated that a sigmoid rather than a hyperbolic model provides a better fit to the deoxy-[Hb + Mb] response to steady state, incremental step exercise test (GRASSI et al, 2003; BOONE et al, 2010) or non-steady state, ramp exercise test (FERREIRA et al, 2007; BOONE et al, 2009, 2010, 2012). This sigmoid pattern indicates a dynamic nonlinear relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$, that is, a faster increase in \dot{Q}_m compared with $\dot{V}O_{2m}$ at the onset of the ramp followed by a progressive slower increase in \dot{Q}_m relative to $\dot{V}O_{2m}$ at the end of exhaustive exercise. This sigmoidal increase in deoxy-[Hb + Mb] response as a function of work rate could be, at least in part, explained by central and/or local

factors such as (1) the mechanical effects of muscle contraction (i.e., muscle pump and rapid vasodilation) in the early phase of a ramp exercise test; (2) the Bøhr effect and the appearance of a lactic acidosis as work rate increases; (3) changes in sympathetic–parasympathetic balance in cardiovascular control; and (4) muscle fibre characteristics and changes in recruitment as work rate increases (ROWELL, 1974; BEHNKE et al, 2003; FERREIRA et al, 2007). From a practical perspective, this sigmoid pattern of the deoxy-[Hb + Mb] response could be used as a suitable tool to assess changes in the nonlinear relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ and to detect early stages of microvascular dysfunction during clinical exercise testing.

As previously mentioned, the information obtained from deoxy-[Hb + Mb] response provides insights into the relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$. For instance, a rightward shift of the pattern of deoxy-[Hb + Mb] during ramp exercise test may be reflective of better perfusion and balance between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$; however, this may also indicate a reduced need for \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ that occurs with lower muscle activation (FERREIRA et al, 2007; CHIN et al, 2011). Chronic exercise training (SHOEMAKER et al, 1996; FERREIRA et al, 2007; BOONE et al, 2009) and/or pharmacological treatment (DREXLER et al, 1995) are examples of interventions that are associated with a rightward shift in the pattern of deoxy-[Hb + Mb] during dynamic exercise; however, it seems logical to speculate that other approaches could have a similar impact on the dynamic adjustment of oxygen delivery and oxygen utilization as well as on the pattern of deoxy-[Hb + Mb] during ramp or incremental step exercise. For instance, nitric oxide (NO), a ubiquitous, gaseous signalling molecule generated through the oxidation of amino acid *L*-arginine, in a process catalyzed by the NO synthase (NOS) enzymes (FØRSTERMANN; SESSA, 2012) or

via the one electron reduction of nitrite (NO_2^-) (LUNDBERG et al., 2009), has been reported to contribute to vasodilation that increases \dot{Q}_m and enhances oxygen delivery to the active musculature in humans (COOPER; GIULIVI, 2007). Dietary supplementation with *L*-citrulline, a nonprotein amino acid that is coproduced with NO as an end product of NOS activity, is thought to increase NO bioavailability in humans (SCHWELDHELM et al., 2008), and would elicit similar responses. Most studies (BAILEY et al., 2015, 2016; GIANNESINI et al., 2011; BENDAHAN et al., 2002), but not all (TARAZONA-DIAZ et al., 2013; CHURCHWARD-VENNE, et al., 2014; CUTRUFELLO et al., 2015), have shown reduced systemic blood pressure and improved exercise efficiency and exercise tolerance following dietary *L*-citrulline supplementation in healthy. While the mechanisms responsible for the latter effects are poorly understood, they likely involve an increased \dot{Q}_m and direct effects of NO on muscle contractile efficiency or mitochondrial function (STAMLER; MEISSNER, 2001; ALVARES et al., 2012). Therefore, dietary supplementation with *L*-citrulline could be a valid approach to further elucidate the mechanisms governing the regulation of both \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ that across exercise intensities.

Therefore, the purpose of this study was to gain better insight into the underlying mechanisms of the sigmoid pattern of deoxy-[Hb + Mb] response to incremental ramp exercise by means of an acute oral *L*-citrulline supplementation. Using changes in NIRS-derived deoxy-[Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary $\dot{V}O_2$ measurements, we hypothesized that the pattern of deoxy-[Hb + Mb] would follow a sigmoid profile in response to the non-steady state ramp exercise test and that this profile would be rightward shifted in response to the acute dietary supplementation with *L*-citrulline. From a practical standpoint, the results from this study would reinforce that the

sigmoid profile of the deoxy-[Hb + Mb] response to incremental ramp exercise test could be used as a suitable tool to assess changes in the nonlinear relationship between \dot{Q}_m and $\dot{V}O_{2m}$ and to detect effective dietary interventions for adjusting the oxygen delivery and oxygen utilization within exercising muscles in humans.

5.2.2 Materiais e Métodos

Subjects

Twelve male adults between 18 and 30 yr of age were recruited to participate in this study. A detailed written explanation of the experimental protocol was given to all subjects before they be tested. None of them smoked tobacco and used dietary supplementation or taken any medication that could affect their cardiorespiratory or metabolic responses to exercise. In the 24 h preceding the first exercise test, they recorded their food intake and this diet was replicated in the 24 h preceding subsequent tests (please see Nutrient Intake section). Additionally, they were instructed to arrive at the laboratory in a rested and fully hydrated state, ≥ 3 h postprandial, and to refrain from caffeine and alcohol intake 6 and 24 h before each test, respectively. Subjects were asked to avoid strenuous exercise in the 24 h preceding each testing session. Finally, they were required to be in good health and none of them could have medical contraindications for participation in the study. All invited subjects had previously been involved in cycle ergometer studies at this intensity in similar conditions, and are fully familiar with the study procedures. All procedures were approved by the Institutional Ethics Committee.

Experimental Overview

All subjects were required to report to the laboratory on seven separate occasions over a period of 6 wk. Upon arrival to the laboratory, subjects rested for 10 min in a seated position. After the rest period, the blood pressure was measured. Subjects were then randomly assigned to ingest 6 g of pure *L*-citrulline, 12 g of pure *L*-citrulline, or energy-matched placebo (see Supplementation protocol section) ~90 min prior to exercise. This approach is based on the findings of MOINARD et al (2008) who reported that 2 - 15 g . day⁻¹ of oral *L*-citrulline elevated plasma *L*-arginine concentration with the peak values being maintained between 70 to 140 min post-ingestion. After the 90 min rest period, a replicated blood pressure measurement were taken. Subjects then performed a ramp incremental exercise test to the limit of tolerance on an electromagnetically braked cycle ergometer. In each ramp exercise protocol, the work rate increased linearly and continuously with a rate of 35 W . min⁻¹ (~0.58 W min⁻¹). Previous studies (BOONE et al, 2009; 2010) have shown that this ramp slope would lead to exhaustion in ~12 min in a group of moderately trained adults. The actual ramp increase in work rate was preceded by 3 min of rest on the cycle ergometer and by 3 min of baseline cycling at 40 W. The baseline value of 40 W was used to ensure that possible changes in mechanical efficiency at very low work rates would not interfere with the linear increase in $\dot{V}O_2$ (BOONE et al, 2008). The test was terminated when the subject could no longer maintain the instructed pedal rate (75 rpm). The instantaneous pedal rate was continuously visualized on a display connected to the cycle ergometer, so that the subject were fully informed about the cadence throughout the exercise tests. All

subjects were asked to arrive in the laboratory in the morning (between 06:00 and 12:00 a.m.) and all exercise tests were performed at the same time (± 2 h) of the day to avoid circadian variance. Of note, all tests were replicated twice by all subjects in each supplement condition (pooled data).

Supplement Protocol

Subjects were randomly assigned to receive either 6 g of pure *L*-citrulline (Arboretum; administered with 0.5 L of water), 12 g of pure *L*-citrulline, or energy-matched placebo (starch) gelatinous capsules in a double-blind, crossover design, with a 7 d washout period between the two conditions. A 7 d washout period is enough because the elimination half-life of a single oral dose of 6 g of *L*-arginine is ~ 24 h (SCHWEDHELM, et al., 2012). Placebo capsules were at the same size, color, and flavor as the *L*-citrulline capsules.

Nutrient Intake

Subjects were instructed to record their food intake for 24 h before the first exercise test and were asked to replicate the same diet before subsequent tests. Under the supervision of nutritionists, they were advised to follow a diet rich in carbohydrate (> 4 g \cdot kg⁻¹) body weight, which, in combination with light training or rest, would allow subjects to start the tests with adequate glycogen stores (PFEIFFER et al, 2010). Diet was assessed with 24 h recalls the days before the tests, and carbohydrate intake of all subjects were confirmed to be > 4 g \cdot kg⁻¹ body weight. The participants were also instructed to report in the dietary records any adverse events from the

dietary supplementation with *L*-arginine or placebo on their health status.

Gas exchange and heart rate measurements

During all exercise tests, pulmonary gas exchange and ventilation were measured continuously on a breath-by-breath basis by means of a portable gas analysis system (K4b₂, Cosmed srl, Rome, Italy). A turbine digital transducer measured inspired and expired airflow; otherwise, an electrochemical cell O₂ analyser and infrared CO₂ analyser simultaneously measured expired gases using a capillary line connected to a mouthpiece. The analyser was calibrated before each test with gases of known concentration, and turbine volume transducer was calibrated using a 3 L syringe (Hans Rudolph, Kansas City, MO). The analyser was previously validated for measuring gas exchanges over a wide range of exercise intensities (MCLAUGHLIN et al, 2001). Heart rate was recorded by means of the K4b₂ system from a chest belt transmission (Polar Electro, Kempele, Finland).

Near Infrared spectroscopy

Deoxy [Hb + Mb] profiles of the quadriceps vastus lateralis muscle was measured by means of a commercially available data acquisition and analysis NIRS system (Portamon, Artinis Medical Systems BV, The Netherlands). A detailed explanation of the principles of operation and algorithms utilized by the system is described elsewhere (ELWELL, 1995; VAN BEEKVELT, 1995). Briefly, the system consists of a small portable unit that contains a light source, which emits near-infrared wavelengths of 750 and 850 nm and a detection probe (30mm away) to measure the

returning signals. The intensity of incidence and transmitted light is transmitted in real time via Bluetooth to a laptop computer and recorded continuously at 10 Hz and used to assess concentration changes from the resting baseline for deoxy-[Hb + Mb] and oxy-[Hb + Mb] hemoglobin and myoglobin. Although the contribution of deoxygenated myoglobin to the NIRS signal is unclear, the terms deoxy-[Hb + Mb] and oxy-[Hb + Mb] referred to the combined concentrations of hemoglobin and myoglobin (KENJALE et al, 2011). The NIRS data represent a relative change based on the optical density from the resting baseline measure for deoxy-[Hb + Mb] and oxy-[Hb + Mb]. Since deoxy-[Hb + Mb] is essentially blood volume insensitive during exercise (GRASSI et al, 2003; FERREIRA et al, 2006), the parameter was assumed to provide an estimate of changes in the fractional O₂ extraction in the area of interrogation (DELOREY et al, 2003).

The Portamon unit was positioned longitudinally on the distal section of vastus lateralis muscle of the left leg and secured in place using an elastic wrap/stocking around the thigh, which was tight enough to avoid probe movement but not to restrict leg blood flow or venous return. The NIRS unit and the skin was covered with a black, light-absorbing cloth to minimize the possibility that extraneous light could influence the signal. Prior to the placement of the NIRS unit, however, the system was calibrated and the skin was shaved. Pen surgical marks were made on the skin to indicate the margins of the unit to check for any downward sliding during the exercise and for accurate repositioning of the unit on the subsequent visits to the laboratory. Skinfold thickness at the site of application of the NIRS unit were determined before the testing trials using Harpenden skinfold caliper. NIRS data was recorded throughout the ramp exercise test. The resulting NIRS data then was

reduced to a 1 Hz Excel data file and stored for later analysis.

Data Analysis

$\dot{V}O_2$ max was defined as the highest 10 s mean value attained before the subject's volitional exhaustion in the test (BAILEY et al, 2010). The gas exchange threshold (GET) was defined as the point at which $\dot{V}CO_2$ production ($\dot{V}CO_2$) began to increase out of proportion in relation to $\dot{V}O_2$ with a systematic rise in minute ventilation (\dot{V}_E)-to- $\dot{V}O_2$ ratio and end tidal $\dot{V}O_2$ max PO_2 , whereas \dot{V}_E -to- $\dot{V}O_2$ ratio and end tidal PCO_2 is stable (BEAVER et al., 1981). Both $\dot{V}O_2$ max and GET were described as a function of body mass. Maximal power output (W_{max}) was determined by the following formula: $W_{max} = W_{out} + [(t/60)35]$, where W_{out} is the power output (W) during the last completed stage and t is the time (s) in the final stage (PFEIFFER et al, 2010). The slope of the time averaged $\dot{V}O_2$ to work rate profiles for ramp exercise test [reflecting the functional $\dot{V}O_2$ gain ($\Delta\dot{V}O_2/\Delta W$)] was determined using linear regression analysis ($y = ax + b$) (BOONE et al, 2012).

Breath-by-breath pulmonary gas exchange data was filtered by removing aberrant data that lay outside 4 standard deviation (SD) of the local mean, as they did not conform to a Gaussian distribution as previously described by LAMARRA, et al (1987). The gas exchange profile then was further time averaged into 5 s bins to provide a single time averaged response for each subject in each dose of L-citrulline and placebo. The second-by-second Δ deoxy-[Hb + Mb] was time aligned and ensemble averaged in the same manner. The ensemble averaged Δ deoxy-[Hb + Mb]

was then normalized ($\% \Delta \text{deoxy-[Hb + Mb]}$) to the total amplitude of the response in the placebo and *L*-citrulline conditions, such that 0% represents the average value of the final 60 s of the 3 min cycling period at 40 W and 100% represents the average value of the final 15 s of the exercise test (i.e., $\Delta \text{deoxy [Hb + Mb]}_{\text{peak}}$). The $\% \Delta \text{deoxy [Hb + Mb]}$ was time aligned with $\dot{V}O_2$ by left-shifting the $\dot{V}O_2$ profile data back by 20 s to account for the circulatory transit delay between muscle and lung; this was undertaken so that changes in ' $\dot{V}O_{2m}$ ' (represented by $\dot{V}O_2$) aligned with changes in the $\% \Delta \text{deoxy-[Hb + Mb]}$ signal (BOONE et al, 2010; MURIAS et al, 2014). If this 20 s value may not precisely match the circulatory time lag in all subjects is unknown; however, this 20 s value has been proposed as a reasonable estimate for the circulatory time delay occurred in the onset of exercise (MURIAS et al, 2013; SPENCER et al, 2012).

The normalized deoxy-[Hb + Mb] was plotted as functions of both work rate and of percentage of W_{max} . This normalization procedure implies that only qualitative comparisons can be made. As proposed by BOONE (2010, 2012), the deoxy-[Hb + Mb] data from the ramp exercise test were fitted by a sigmoid model, as follows:

$$F(x) = f_0 + A/(1+\exp -(-c+dx))$$

where f_0 represents the baseline, A is the amplitude, d is the slope of the sigmoid, and c/d is the x value corresponding to 50% of A .

Statistical Analysis

The mean values \pm SD were analysed for time of exhaustion, $\dot{V}O_2\text{max}$, GET, W_{max} , and functional $\dot{V}O_2$ gain in each supplementation condition and these parameters were further compared using one-way ANOVA. The sigmoid model for the pattern of deoxy[Hb + Mb] was calculated by means of fit curve in Sigmaplot 10.0. From the output file, the R^2 values, the residual sum of squares, and the F -value were calculated to determine the best fitting model for each individual test. The mean values \pm SD for the parameters in the best fitting model were determined and compared between the supplementation conditions using one-way ANOVA. Significance was set at $P < 0.05$.

5.2.3 Resultados

The ramp exercise protocol lasted, on average, 847 ± 16 sec and 856 ± 21 sec in both 6 g and 12 g *L*-citrulline supplementation conditions, whereas the ramp protocol lasted 856 ± 17 sec in placebo condition (Fig. 1A). As unexpected, participants reached a similar W_{max} in both 6 g and 12 g *L*-citrulline supplementation conditions ($312.2W \pm 10$ and $316.6W \pm 14$) compared with placebo condition ($313.3W \pm 10$) (Fig. 1B, $P > 0.05$).

*** Insert Figure 1 ***

In Figure 2, the deoxy [Hb + Mb] response for the ramp protocol in the distal section of the musculus vastus lateralis is presented for a representative subject. In Table 1, the means values \pm SD for the parameters of the sigmoid model of three supplementation conditions are presented. The baseline (f_0), amplitude (A) and the

slopes of the sigmoid (d) did not differ significantly between the three supplementation conditions. The c/d point of the sigmoid, that is, the work rate corresponding to $(f_0 + A)/2$ was also similar between the three supplementation conditions, when described as a function of relative ($\%peakP$) work rate for each supplementation condition.

*** Insert Figure 2 ***

*** Insert Table 1 ***

5.2.4 Discussão

The purpose of this study was to gain better insight into the underlying mechanisms of the sigmoid pattern of deoxy-[Hb + Mb] response to incremental exercise by means of an acute oral *L*-citrulline supplementation. Using changes in NIRS-derived deoxy-[Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary $\dot{V}O_2$ measurements, we hypothesized that the pattern of deoxy-[Hb + Mb] would follow a sigmoid profile in response to the non-steady state ramp exercise test and that this profile would be rightward shifted in response to the dietary supplementation with *L*-citrulline. As expected, the pattern of deoxy [Hb + Mb] followed a sigmoid profile in response to the non-steady state, ramp exercise test; however, it should be noted that the sigmoid profile was not shifted in response to the acute dietary supplementation with *L*-citrulline. This finding indicates that *L*-citrulline administration was not able to affect NIRS-derived deoxy [Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary $\dot{V}O_2$ measurements during a ramp exercise test.

The findings of this research are in agreement with previous studies (TARAZONA-DIAZ et al., 2013; CHURCHWARD-VENNE et al., 2014; CUTRUFELLO et al., 2015) and reinforce that oral supplementation with *L*-citrulline might not be able to cause a better regulation of the relationship between Q_m and $\dot{V}O_{2m}$ during dynamic exercise in healthy subjects. The reasons for these findings are yet unclear; however, it could be speculated that an acute dose of *L*-citrulline (6 g and 12 g) might not be enough to proportionate any change in cardiovascular and/or metabolic responses during aerobic exercise in healthy adults. A plausible reason is related to the degradation of *L*-arginine in the systemic circulation. Although the supplementation with *L*-citrulline increased the plasma [*L*-arginine] in a dose-response manner, it should be noted that plasma [*L*-arginine] is rapidly down regulated by systemic extraction and catabolism by the liver (YU et al., 1996) and by competition with asymmetric dimethylarginine and other *L*-arginine analogs for the transporter y^+ carrier (CLOSS et al., 1997). However, this hypothesis is more exploratory in nature.

Previous studies have shown the occurrence of a linear steady state relationship between Q_m and $\dot{V}O_2$ to constant load exercise performed across a wide range of exercise intensities (DELOREY et al, 2003; FERREIRA et al, 2005; BOONE et al, 2008, 2009, 2010). As a consequence, when plotted as a function of work rate, the profile of fractional oxygen extraction or $C(a-v)O_2$ across the same range of exercise displays a hyperbolic pattern, since $\dot{V}O_{2m} = Q \times C(a-v)O_2$ (ROWELL, 1974; PROCTOR et al, 1998; BARKER et al, 1999). If deoxy [Hb + Mb] is proportional to fractional oxygen extraction or $C(a-v)O_2$, a similar hyperbolic pattern would be expected for deoxy [Hb + Mb] as a function of work rate (DELOREY et al, 2003). Most studies, however, demonstrated that a sigmoid rather than a hyperbolic model

provides a better fit to the deoxy [Hb + Mb] response to steady state, incremental step exercise test (GRASSI et al, 2003; BOONE et al, 2010) or non-steady state, ramp exercise test (FERREIRA et al, 2007; BOONE et al, 2009, 2010, 2012). The rapid increase followed by a slowing effect of Q_m could be related to muscle fiber recruitment. In this context, different profiles of $C(a-v)O_2$ as a function of Q_m between slow twitch and fast twitch muscles have been reported in rats (FERREIRA et al, 2006). However, in the present investigation, no EMG measurements were carried out. Further studies are encouraged to examine the relationship between type fiber recruitment, changes in sigmoid pattern of deoxy [Hb + Mb] curves, and nutritional interventions, such as *L*-citrulline.

5.2.5 Conclusão

In conclusion, the present study demonstrated that the deoxy [Hb + Mb] response follows a similar sigmoid pattern to non-steady-state, incremental ramp exercise in a group of moderately trained adults. Contrary to our hypothesis, this sigmoid profile was not right shifted in response to the acute dietary supplementation with *L*-citrulline. From a practical standpoint, these results reinforced the role of *L*-citrulline supplementation as a poorly effective dietary intervention for adjusting the oxygen delivery and oxygen utilization within exercising muscles in humans.

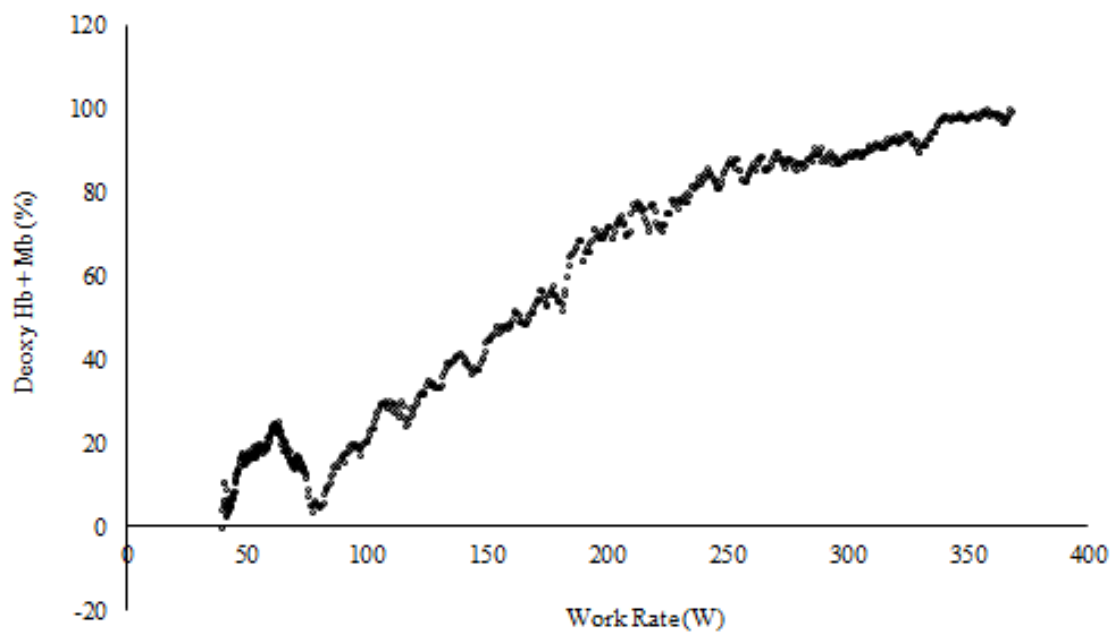
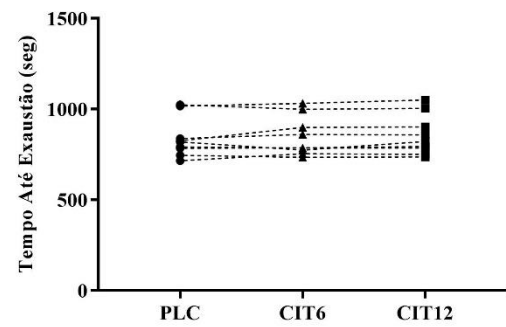
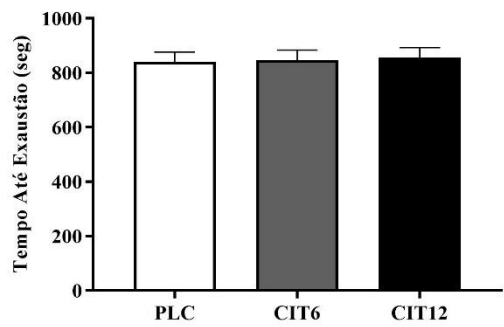
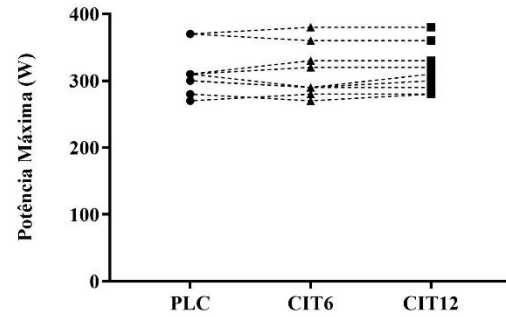
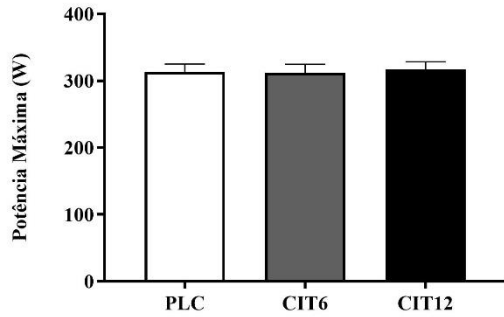
5.2.6 Legendas Tabelas/Figuras

Figure 1. Group mean (A and C) and individual (B and D) responses of W_{\max} and time to exhaustion during a ramp incremental exercise until volitional exhaustion, following *Pla* (white bar), *Cit6* (gray bar), and *Cit12* (black bar). Values are shown as means \pm SE.

Figure 2. Deoxy [Hb + Mb] response as function of absolute work rate for a representative subject.

Table 1. Mean \pm SD values for the baseline (f_0 ; %), amplitude (A;%), and slope (d) of the sigmoid model fitted to the deoxy [Hb + Mb] response for ramp protocols as functions of relative work rate ($\%peakP^{-1}$).

5.2.7 Tabelas/Figuras



	<i>Placebo</i>		<i>L-citrulline 6 g</i>		<i>L-citrulline 12 g</i>	
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>
f0 (%)	-5.7	3.2	-5.8	3.1	-5.7	3.9
A (%)	102.1	8.0	105.3	9.2	103.3	11.7
d (% peakP ⁻¹)	7.1	4.6	6.6	4.1	6.9	4.2

REFERÊNCIAS

Akashi K, Miyake C, Yokota A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* 2001; 508: 438–442.

Allen DG, Lamb DG, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008; 88: 287-332.

Alsop P, Hauton D. Oral nitrate and citrulline decrease blood pressure and increase vascular conductance in young adults: a potential therapy for heart failure. *Eur J Appl Physiol.* 2016; 116: 1651-1661.

Alvares TS, Conte CA, Paschoalin VM, Silva JT, Meirelles CM, Bhambhani YN, Gomes PS. Acute L-arginine supplementation increases blood volume but not strength performance. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2012; 37: 115-126.

Alvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, Paschoalin VM, Gomes PS. L-arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med.* 2011; 41: 233-248.

Bahri S, Zerrouk N, Aussel C, Moinard C, Crenn P, Curis E, Chaumeil JC, Cynober L, Sfar S. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutrition.* 2013; 29: 479-484.

Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, Blackwell JR, Dimmena FJ, Wilkerson DP, Tarr J, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2009; 107: 1144-1155.

Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, Blackwell JR, Dimmena FJ, Wilkerson DP, Jones AM. Acute L-arginine supplementation reduces the O₂ cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol.* 2010; 109: 1394-1403, 2010.

Bailey SJ, Vanhatalo A, Winyard P, Jones AM. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: Its role in human exercise physiology. *Eur J Sport Sci.* 2012; 12: 309-320.

Bailey SJ, Blackwell JR, Lord T, Vanhatalo A, Winyard P, Jones AM. L-citrulline supplementation improves O₂ uptake kinetics and high-intensity exercise performance in humans. *J Appl Physiol.* 2015; 119: 385-395.

Bailey SJ, Blackwell JR, Williams E, Vanhatalo A, Wylie LJ, Winyard P, Jones AM. Two weeks of watermelon juice supplementation improves nitric oxide bioavailability but not endurance exercise performance in humans. *Nitric Oxide.* 2016; 59: 10-20.

Barker RC, Hopkins SR, Kellogg N, Olfert IM, Brutsaert TD, Gavin TP, Entin PL, Rice AJ, Wagner PD. Measurement of cardiac output during exercise by open-circuit acetylene uptake. *J Appl Physiol.* 1999; 87: 1506-1512.

Beaver WL, Lamarra WL, Wassermann K. Breath-by-breath measurement of true alveolar gas exchange. *J Appl Physiol.* 1981; 51: 1662-1675.

Behnke BJ, McDonough P, Padilla DJ, Musch TI, Poole DC. Oxygen exchange profile in rat muscle of contrasting fibre types. *J Physiol.* 2003; 549: 597-605.

Bendahan D, Mattei JP, Ghattas B, Confort-Gouny S, Le Guern ME, Cozzone PJ. Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *Br J Sports Med.* 2002; 36: 282-289.

Bescós R, Gonzalez-Haro C, Pujol P, Drobic F, Alonso E, Santolaria ML, Ruiz O, Esteve M, Galilea P. Effects of dietary L-arginine intake on cardiorespiratory and metabolic adaptation in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2009; 19: 355–365.

Bescós R, Sureda A, Tur JA, Pons A. The effect of nitric-oxide-related supplements on human performance. *Sports Med.* 2009; 42: 99-117.

Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC. L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol.* 1998; 46: 489–497.

Boger RH, Tsikas D, Boger SM. Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidine-15N₂]-arginine to 12N-labeled nitrate by gas chromatography-mass spectrometry. *Nitric Oxide.* 2014; 11: 1-8.

Bohé J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human muscle protein synthesis is modulated by extracellular, not intramuscular amino acid availability: A dose-response study. *J Physiol.* 2003; 552: 315-324.

Boirie Y, Gachon P, Beaufriere B. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65: 489–495.

Boone J, Bouckaert J, Barstow TJ, Bourgois J. Influence of priming exercise on muscle deoxy [Hb + Mb] during ramp cycle exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2012, 112: 1143-1152.

Boone J, Bourgois J. The oxygen uptake response to incremental ramp exercise: Methodological and physiological issues. *Sports Med.* 2012; 42: 511-526.

Boone J, Koppo K, Barstow TJ, Bouckaert J. Pattern of deoxy [Hb + Mb] during ramp cycle exercise: influence of aerobic fitness status. *Eur J Appl Physiol.* 2009. 105: 851-859.

Boone J, Koppo K, Barstow TJ, Bouckaert J. Effect of exercise protocol on deoxy [Hb + Mb]: Incremental step versus ramp exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2010; 42: 935-942.

Boone J, Koppo K, Bouckaert J. The VO₂ response to submaximal ramp cycle exercise: Influence of ramp slope and training status. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 161: 291-297.

Breuillard C, Cynober C, Moinard C. Citrulline and nitrogen homeostasis: an overview. *Amino Acids*. 2015; 47: 685-691.

Brown JC, Harhay MO, Harhay MN. Sarcopenia and mortality among a population-based sample of community-dwelling older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016; 7: 290-298.

Buford BN, Koch AJ. Glycine-arginine-alpha-ketoglutaric acid improves performance of repeated cycling sprints. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36: 583–587.

Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol Reprod*. 1995; 52: 485-489.

Callis A, Magnan de Bornier B, Serrano JJ, Bellet H, Saumade R. Activity of citrulline malate on acid-base balance and blood ammonia and amino acid levels: study in the animal and in man. *Arzneimittelforschung*. 1991; 41: 660-663.

Casanello P, Sobrevia L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems $y^+/hCAT-1$ and $y^+/hCAT-2B$ and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 2002; 91: 127-134.

Castaneda C, Charnley JM, Evans WJ, Crim MC. Elderly women accommodate to a low-protein diet with losses of body cell mass, muscle function, and immune response. *Am J Clin Nutr*. 1995; 62: 30-39.

Castillo L, deRojas TC, Chapman TE, Vogt J, Burke JF, Tannenbaum SR, Young VR. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 193-197.

Chin LM, Kowalchuk JM, Barstow TJ, Kondo N, Amano T, Shiojiri T, Koga S. The relationship between muscle deoxygenation and activation in different muscles of the quadriceps during cycle ramp exercise. *J Appl Physiol*. 2011; 111: 1259-1265.

Churchward-Venne TA, Cotie LM, MacDonald MJ, Mitchell CJ, Prior T, Baker SK, Phillips SM. Citrulline does not enhance blood flow, microvascular circulation, or myofibrillar protein synthesis in elderly men at rest or following exercise. *Am J Physiol*. 2014; 307: E71-E83.

Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y^+ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*. 1997; 1: 65-73.

Cooper CE, Giulivi C. Nitric oxide regulation of mitochondrial consumption: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol*. 2007; 292: C1993-C2003.

Crenn O, Cynober L. Effect of intestinal resections on arginine metabolism: Practical implications for nutrition support. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010; 13: 65-69.

Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology*. 2000; 119: 1496-1505.

Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, Cynober L. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 2005; 29: 177-205.

Curis E, Crenn P, Cynober L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007; 10: 620-626.

Cutrufello PT, Gadomski SJ, Zavorsky GS. The effect of L-citrulline and watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. *J Sports Sci*. 2015; 33: 1459-1466.

Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 32: 423-429.

Delorey DS, Kowalchuk JM, Paterson DH. Relationship between pulmonary O₂ uptake kinetics and muscle deoxygenation during moderate-intensity exercise. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 113-120.

Devés R, Bpyd CA. Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Physiol Rev*. 1998; 78: 487-545.

Dong JY, Qin LQ, Zhang Z, Zhao Y, Wang J, Arigoni F, Zhang W. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am Heart J*. 2011; 162: 959-965.

Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Münzel T, Hornig B. Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 1995; 76: 13-18.

Ferreira LF, Townsend DK, Lutjemeier BJ, Barstow TJ. Muscle capillary blood flow kinetics estimated from pulmonary O₂ uptake and near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol*. 2005; 98: 1820-1828.

Ferreira LF, McDonough P, Behnke BJ, Musch TI, Poole DC. Blood flow and O₂ extraction as a function of O₂ uptake in muscle composed of different fibre types. *Resp Physiol Neurobiol*. 2006; 153: 237-249.

Ferreira LF, Koga S, Barstow TJ. Dynamics of noninvasively estimated microvascular O₂ extraction during ramp exercise. *J Appl Physiol*. 2007; 103: 1999-2004.

Figuroa A, Alvarez-Alvarado S, Jaime SJ, Kalfon R. L-Citrulline supplementation attenuates blood pressure, wave reflection and arterial stiffness responses to metaboreflex and cold stress in overweight men. *Br J Nutr*. 2016; 116: 279-285.

Figuroa A, Sanchez-Gonzalez MA, Perkins-Veazie PM, Arjmandi BH. Effects of watermelon supplementation on aortic blood pressure and wave reflection in individuals with prehypertension: A pilot study. *Am J Hypertens*. 2011; 24: 40-44.

Figuroa A, Wong A, Jaime SJ, Gonzales JU. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017; 20: 92-98.

Førstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; 33: 829–837.

Ghose C, Raushel FM. Determination of the mechanism of the argininosuccinate synthetase reaction by static and dynamic quench experiments. *Biochemistry*. 1995; 24: 5894–5898.

Grassi B, Pogliaghi S, Rampichini S, Quaresima V, Ferrari M, Marconi C, Cerretelli P. Muscle oxygenation and pulmonary gas exchange kinetics during cycle exercise on-transitions in humans. *J Appl Physiol*. 2003; 95: 149-158.

Grimble GK. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *J Nutr*. 2007; 137: 1693-1701.

Harper AJ, Ferreira LF, Lutjemeier BJ, Townsend DK, Barstow TJ. Human femoral artery and estimated muscle capillary blood flow kinetics following the onset of exercise. *Exp Physiol*. 2006; 91: 661-671.

Hilderman RH, Casey TE, Pojoga LH. P₁,P₄-Diadenosine 50tetrphosphate modulates L-arginine and L-citrulline uptake by bovine aortic endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000; 375: 124–130.

Hoogenraad N, Totino N, Elmer H, Wraight C, Alewood P, Johns RB. Inhibition of intestinal citrulline synthesis causes severe growth retardation in rats. *Am J Physiol Gastrointest*. 1985; 249: G792–G799.

Houghton JE, Bencini DA, O'Donovan GA, Wild JR. Protein differentiation: A comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 4864–4868.

Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A, Renouf S, Lavoigne A. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem.* 2003; 270: 1887–1899.

Jones AM. Dietary nitrate supplementation and exercise performance. *Sports Med.* 2014; 44: 35-45.

Jourdan M, Nair KS, Carter RE, Schimke J, Ford GC, Marc J, Aussel C, Cynober L. Citrulline stimulates muscle protein synthesis in the post-absorptive state in healthy people fed a low-protein diet: A pilot study. *Clin Nutr.* 2015; 34: 449-456.

Keilhoff G, Wolf G. Citrulline immunohistochemistry may not necessarily identify nitric oxide synthase activity: The pitfall of peptidylarginine deiminase. *Nitric Oxide.* 2003; 8: 31-38.

Kelly J, Vanhatalo A, Wilkerson DP, Wylie LJ, Jones AM. Effects of nitrate on the power-duration relationship for severe-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2013; 45: 1798-1806.

Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, Robbins JL, Johnson JL, Vanbruggen M, Privette G, Yim E, Kraus WE, Allen JD. Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol*, 2011; 110: 1582-1591.

Kim IY, Schutzler SE, Schrader A, Spencer HJ, Azhar G, Deutz NE, Wolfe RR. . et al. Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. *Am J Physiol*, v. 309, p. E915-E924, 2015.

Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, Yasuda T, Ikeda S, Hirano R, Terazono H, Crackower MA, Kondo I, Tsui LC, Scherer SW, Saheki T. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet.* 1999; 22: 159–163.

Koppo K, Taes YE, Pottier A, Boone J, Bouckaert J, Derave W. Dietary arginine supplementation speeds pulmonary $\dot{V}O_2$ kinetics during cycle exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2009; 41: 1626–1632.

Kuhn KP. Oral citrulline effectively elevates plasma arginine levels for 24 hours in normal volunteers. *Circulation.* 2002; 106: II1–766S.

Lamarra N, Whipp BJ, Ward SA, Wasserman K. Effects of interbreath fluctuations on characterizing exercise gas exchange kinetics. *J Appl Physiol.* 1987; 62: 2003-2012.

Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Gilchrist M, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation reduces the O_2 cost of walking and running: a placebo-controlled study. *J Appl Physiol.* 2010; 110: 591-600.

Lansley KE, Winyard PG, Bailey SJ, Vanhatalo A, Wilkerson DP, Blackwell JR, Gilchrist M, Benjamin N, Jones AM. Acute dietary nitrate supplementation improves cycling time trial performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2011; 43: 1125-1131.

Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol.* 2007; 191: 59-66.

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; 15: 342-347.

Lee KE, Kang YS. Characteristics of L-citrulline transport through blood-brain barrier in the brain capillary endothelial cell line (TR-BBB cells). *J Biomed Sci.* 2017; 24: 28.

Lemke CT, Howell PL. Substrate induced conformational changes in argininosuccinate synthetase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 13074–13081.

Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F, Bankir L. Localization of arginine synthesis along rat nephron. *Am J Physiol.* 1990; 259: F916–F923.

Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000; 190: 244-254.

Lichter-Konecki U, Caldovic I, Morizono H. Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle: University of Washington, 2013.

Ludwig RA. Arabidopsis chloroplasts dissimilate L-arginine and L-citrulline for use as N source. *Plant Physiol.* 1993; 101: 429–434.

Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from inorganic nitrate and nitrite: Role in physiology, nutrition and therapeutics. *Arch Pharm Res.* 2009; 32: 1119-1126.

Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 156-167.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Bøger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 798: 231–239.

Martinelli D, Diodato D, Ponzi E. The hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2015; 10: 29.

McLaughlin JE, King GA, Howley ET, Bassett DR Jr, Ainsworth BE. Validation of the Cosmed K4b₂ portable metabolic system. *Int J Sports Med.* 2001; 22: 280-284.

Moinard C, Nicolis I, Neveux N, Darquy S, Bénazeth S, Cynober L. Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: The citrudose pharmacokinetic study. *Br J Nutr.* 2008; 99: 855-887.

Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: Physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 811: 60-67.

Morris Jr SM. Arginine: Beyond protein. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 508-512.

Morris Jr SM. Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *J Nutr.* 2007; 137: 1602-1609.

Morris Jr SM. Arginine metabolism revisited. *J Nutr.* 2016; 146: 2579-2586.

Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY, Mirand PP. Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol.* 1995; 268: E328–E335.

Murias JM, Spencer MD, Keir DA, Paterson DH. Systemic and vastus lateralis muscle blood flow and O₂ extraction during ramp incremental cycle exercise. *Am J Physiol.* 2013; 304: 720-725.

Murias JM, Spencer MD, Paterson DH. The critical role of O₂ provision in the dynamic adjustment of oxidative phosphorylation. *Exerc Sport Sci Rev.* 2014; 42: 4-11.

Neveux N, David P, Cynober L. Measurement of amino acids concentrations in biological fluids and tissues using ion exchange chromatography. In: Cynober L (editor) *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2004.

Noszál B, Kassai-Tánczos R. Microscopic acid-base equilibria of arginine. *Talanta.* 1991; 38: 1439–1444.

Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K. Short-term effects of *L*-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. *Int J Cardiol.* 2012; 155: 257-261.

Orozco-Gutiérrez JJ, Castillo-Martínez L, Orea-Tejeda A, Vázquez-Díaz O, Valdespino-Trejo A, Narváez-David R, Keirns-Davis C, Carrasco-Ortiz O, Navarro-Navarro A, Sánchez-Santillán R. Effect of *L*-arginine or *L*-citrulline oral

supplementation on blood pressure and right ventricular function in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Cardiol J.* 2012; 17: 612-618.

Osowska S, Moinard C, Neveux N, Loï C, Cynober L. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut.* 2004; 53: 1781-1786.

Osowska S, Neveux N, Nakib S. Impairment of arginine metabolism in rats after massive intestinal resection: Effect of parenteral nutrition supplemented with citrulline compared with arginine. *Clin Sci.* 2008; 115: 159-166.

Ostergaard L, Stankevicius E, Andersen MR, Eskildsen-Helmond Y, Ledet T, Mulvany MJ, Simonsen U. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. *Am J Physiol.* 2007; 293: H2894-H2903.

O'Sullivan D, Brosnan JT, Brosnan ME. Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused rat liver. *Biochem J.* 1998; 330: 627-632.

Oyanagi K, Sogawa H, Minami R, Nakao T. A new transport interaction of dibasic amino acids and citrulline in human kidney. *Tohoku J Exp Med.* 1981; 134: 55-58.

Pastor CM, Morris SM Jr, Billiar TR. Sources of arginine for induced nitric oxide synthesis in the isolated perfused liver. *Am J Physiol.* 1995; 269: 861-866.

Pfeiffer B, Stellingwerff T, Zaltas E, Jeukendrup AE. Oxidation of solid versus liquid CHO sources during exercise. *Med Sci Sport Exerc.* 2010; 42: 2030-2037.

Plauth M, Schneider BH, Raible A, Hartmann F. Effects of vascular or luminal administration and of simultaneous glucose availability on glutamine utilization by isolated rat small intestine. *Int J Colorectal Dis.* 1999; 14: 95-100.

Pliska V, Schmidt M, Fauchere JL. Partition coefficients of amino acids and hydrophobic parameters of their side-chains as measured by thin-layer chromatography. *J Chromatogr.* 1981; 216: 79-92.

Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in streptococcus lactis. *J Bacteriol.* 1987; 1: 5597-5604.

Porter RK. Mammalian mitochondrial inner membrane cationic and neutral amino acid carriers. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics.* 2000; 1459: 356–362.

Proctor DN, Beck KC, Shen PH, Eickhoff TJ, Halliwill JR, Joyner MJ. Influence of age and gender on cardiac output – VO₂ relationships during submaximal cycle ergometry. *J Appl Physiol.* 1998; 84: 599-605.

Quinone SC, Thoene JG. Citrullinemia Type I. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle: University of Washington, 2004.

Rafiee P, Ogawa H, Heidemann J, Li MS, Aslam M, Lamirand TH, Fisher PJ, Graewin SJ, Dwinell MB, Johnson CP, Shaker R, Binion DG. Isolation and characterization of human esophageal microvascular endothelial cells: Mechanisms of inflammatory activation. *Am J Physiol.* 2003; 285: G1277-G1292.

Rauschel FM, Seiglie JL. Kinetic mechanism of argininosuccinate synthetase. *Arch Biochem Biophys.* 1983; 225: 979–985.

Reichard P. Ornithine carbamyl transferase from rat liver. *Acta Chem Scand.* 1957; 11: 523–536.

Romero MJ, Platt DH, Caldwell RB, Caldwell RW. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006; 24: 275-290.

Rosenberg IH. Summary comments. *Am J Clin Nutr.* 1989; 50: 1231-1233.

Roubenoff R, Hughes VA. Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000; 55: 716-724.

Rowell LB. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol Rev.* 1974; 54: 75-159.

Schaefer A, Piquard F, Geny B, Doutreleau S, Lampert E, Mettauer B, Lonsdorfer J. L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. *Int J Sports Med.* 2002; 23: 403-407.

Schmidlin A, Fischer S, Wiesinger H. Transport of *L*-citrulline in neural cell cultures. *Dev Neurosci.* 2000; 22: 393–398.

Schuegraf A, Ratner S, Warner RC. Free energy changes of the argininosuccinate synthetase reaction and of the hydrolysis of the inner pyrophosphate bond of adenosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1960; 235: 3597..

Schwedhelm E, Maas R, Freese R, Jung D, Lukacs Z, Jambrecina A, Spickler W, Schulze F, Böger RH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral *L*-citrulline and *L*-arginine: Impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65: 51-59.

Shah P, Shah V. Arginine supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD004339, 2007

Shoemaker JK, Phillips SM, Green HJ, Hughson RL. Faster femoral artery blood velocity kinetics at the onset of exercise following short-term training. *Cardiovasc Res.* 1996; 31: 278-286.

Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I, Mathers JC. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: A systematic review and meta-analysis. *J Nutr.* 2013; 143: 818-826.

Spencer MD, Murias JM, Paterson DH. Characterizing the profile of muscle deoxygenation during ramp incremental exercise in young men. *Eur J Appl Physiol.* 2012; 12: 3349-3360.

Spriet LL, Hargreaves M. Overview of exercise metabolism. In: Spriet LL, Hargreaves M (editors). *Exercise metabolism*. Champaign: Human Kinetics, 2006.

Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 2001; 81: 209-237, 2001

Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S. *Rompp encyclopedia of natural products*. Stuttgart: Thieme Medical Publishers, 2000.

Stevens BR, Godfrey MD, Kaminski TW, Braith RW. High intensity dynamic human muscle performance enhanced by a metabolic intervention. *Med Sci Sports Exerc*. 2000; 32: 2102–2108.

Sugawara K, Yoshizawa Y, Tzeng S, Epstein WL, Fukuyama K.. Colorimetric determination of citrulline residues in proteins. *Anal Biochem*. 1998; 265: 92–96.

Suzuki Y, Murakami T, Haruna Y, Kawakubo K, Goto S, Makita Y, Ikawa S, Gunji A. *Acta Physiol Scand*. 1994; 616: 5-18.

Suzuki T, Morita M, Kobayashi Y, Kamimura A. Oral L-citrulline supplementation enhances cycling time trial performance in healthy trained men: Double-blind randomized placebo-controlled 2-way crossover study. *J Int Soc Sports Nutr*. 2016; 13: 6.

Takiguchi M, Matsubasa T, Amaya Y, Mori M. Evolutionary aspects of urea cycle enzyme genes. *Bioessays*. 1989; 10: 163–166.

Takiguchi M, Mori M. Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem J*. 1995; 312: 649–659.

Tarazona-Díaz MP, Alacid F, Carrasco M, Martínez I, Aguayo E. Watermelon juice: Potential functional drink for sore muscle relief in athletes. *J Agri Food Chem*. 2013; 61: 7522-7528.

Toffoli P. Structure de l'acide L-amino-2 Uréido-5 Pentanoïque. *Acta Cryst.* 1987; 43: 945–947.

Vadgma JG, Evered DF. Characteristics of L-citrulline transport across rat small intestine in vitro. *Pediatr Res.* 1992; 32: 472–478.

van Beekvelt MC, Borghuis MS, van Engelen BG, Wevers RA, Colier WN. Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-infrared spectroscopy in human skeletal muscle. *Clin Sci.* 2001; 101: 21-28.

Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Pavey TG, Wilkerson DP, Benjamin N, Winyard PG, Jones AM. A. 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.* 2010; 299: R1121-R1131.

Vanhatalo A, Bailey SJ, DiMenna FJ, Blackwell JR, Wallis GA, Jones AM. No effect of acute L-arginine supplementation on O₂ cost or exercise tolerance. *Eur J Appl Physiol.* 2013; 113: 1805-1819.

Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SW. Thirty years of saying NO: Sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator. *Circ Res.* 2016; 119: 375-396.

Wei XQ. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 375: 408-411.

Wijnands KA, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA, Poeze M. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS One.* 2012; 7: e37439.

Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol.* 1981; 241: E473-E480.

Wong A, Alvarez-Alvarado S, Jaime SJ, Kinsey AW, Spicer MT, Madzima TA, Figueroa A. Combined whole-body vibration training and *L*-citrulline supplementation improves pressure wave reflection in obese postmenopausal women. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41: 292-297.

Wong JM, Billiar TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol.* 1995; 34: 155-170.

Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr.* 1998; 128: 1249–1252.

Wu G, Meininger CJ. Analysis of citrulline, arginine, and methylarginines using high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 2008; 440: 177-189.

Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998; 336: 1-17.

Yamauchi O, Takaba T, Sakurai T. Solution equilibria of histidinecontaining ternary amino acid-copper(II) complexes in 20v/v% dioxane-water. *Bull Chem Soc Jpn.* 1980; 53: 106–111.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci.* 2015; 129: 83-94.