



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANA PAULA DA FONSECA ARCOVERDE CABRAL DE MELLO

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL AGUDA DE L-CITRULINA E L-CITRULINA MALATO:  
efeitos moleculares relacionados ao metabolismo do óxido nítrico e à angiogê-  
nese no músculo de ratos**

Recife  
2024

ANA PAULA DA FONSECA ARCOVERDE CABRAL DE MELLO

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL AGUDA DE L-CITRULINA E L-CITRULINA MALATO:  
efeitos moleculares relacionados ao metabolismo do óxido nítrico e a angiogê-  
nese no músculo esquelético de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutora em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Dra. Carol Virgínia Góis Leandro

Coorientador: Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva

Recife

2024

|      |  |  |      |
|------|--|--|------|
| 2024 |  | <p>SUPLEMENTAÇÃO ORAL AGUDA DE L-CITRULINA E L-CITRULINA MALATO:</p> <p>efeitos moleculares relacionados ao metabolismo do óxido nítrico e a angiogênese no músculo esquelético de ratos</p> <p>Ana Paula da Fonseca Arcoverde Cabral de Mello</p> | UFPE |
|------|--|--|------|

ÁREA PARA FICHA CATALOGRÁFICA

ANA PAULA DA FONSECA ARCOVERDE CABRAL DE MELLO

**SUPLEMENTAÇÃO ORAL AGUDA DE L-CITRULINA E L-CITRULINA MALATO:  
efeitos moleculares relacionados ao metabolismo do óxido nítrico e à angiogê-  
nese no músculo de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutora em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em: 26 de fevereiro de 2024.

**Banca examinadora**

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Prof. Dr. Diogo Antônio Alves de Vasconcelos** (Presidente e examinador interno)

Instituição: Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde - UFPE.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Profa. Dra. Thaysa Ghiarone de Araújo Silva** (examinadora externa)

Instituição: Cooper Medical School / Rowan University.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz** (examinador externo)

Instituição: Departamento de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória – UFPE.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni** (examinadora externa)

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas - Universidade Estadual de Campinas.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva** (examinador externo)

Instituição: Departamento de Educação Física – UTFPR.

Assinatura: \_\_\_\_\_.

**Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni** (examinadora externa)

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP.

*À Profa. Dra. Carol Leandro , “uma mulher que corre com os lobos”<sup>1</sup>: por seu poderoso e incansável trabalho pela ciência, pelo ensino superior e, sobretudo, pela justiça social - se o seu sonho do CAV não tivesse se tornado realidade, eu não teria chegado até aqui.*

*Ao Prof. Dr. Adriano Eduardo, por sua longa e dedicada caminhada da periferia de São Paulo até o pódio, “porque vencer [sempre foi] o único caminho”<sup>2</sup>: o produto perfeito da força e competência da classe trabalhadora, que não embrutece e não perde a ternura<sup>3</sup>, estendendo a mão para levantar consigo tantos outros, como eu.*

---

<sup>1</sup> Referência ao livro homônimo da autora Clarissa Pinkola Estés.

<sup>2</sup> Referência à canção “Na Fé Firmão” de autoria do compositor Mano Brown.

<sup>3</sup> Referência à frase de Ernesto Che Guevara.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Eduardo, por sua orientação sempre assertiva e gentil, e pela imensa confiança depositada nessa árdua caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carol Leandro, pelas muitas portas abertas e pela generosidade com que me acolheu.

À CAPES, pela bolsa de doutorado, que me permitiu dedicação exclusiva à construção desta tese.

Aos professores Dr. Diogo Vasconcelos, Dra. Dr. Tanus Santos, Dra. Adriana Torsoni, Dra. Viviane Nogueira e Dra. Raquel Aragão, pela disponibilidade de contribuir para este trabalho, integrando a banca avaliadora da tese.

Às muitas pessoas que colaboraram para a construção desse trabalho e doaram suas mãos, insumos, equipamentos, estrutura e, principalmente, tempo para que esse projeto se tornasse uma tese, aqui descritas:

Ao Prof. Dr. Tanus Santos e à técnica Sandra Conde Tella, pela generosa acolhida no Laboratório de Farmacologia da USP de Ribeirão e por toda colaboração para a análise dos metabólitos de NO.

À Profa. Dra. Adriana Torsoni e à Dra. Laís Simino, pela generosa acolhida no Laboratório de Distúrbios do Metabolismo da UNICAMP – Limeira, e por toda colaboração para a análise dos genes aqui reportados.

A Jonnathan Silva e à Ana Clara Nascimento, por dividirem comigo as muitas horas de cuidado animal, experimentos e coletas no CAV - UFPE.

Wellington Pereira, Mirelly Cunha, Sidiane Barros, Jonnathan e Ana Clara, por dividirmos as muitas horas de experimentos e coletas, risadas, orações e lágrimas no Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do CAV – UFPE.

À Profa. Viviane Nogueira e ao Prof. Thyago Queiroz, por viabilizarem o uso do Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, no CAV – UFPE, e também pelas muitas conversas científicas e sobre a vida, que me foram tão necessárias e significativas.

Ao Dr. Danilo Fontes, pela manutenção sempre dedicada do Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, no CAV – UFPE.

Ao Dr. Vinícius Vasconcelos e à Dra. Juliette Freitas, pelo suporte no cuidado animal no Biotério de Manutenção e Experimentação do CAV – UFPE.



Ao “Seu Galego”, motorista do CAV, pela direção sempre solícita nas muitas idas e vindas para transportar os animais e nitrogênio do Recife para Vitória e, para além disso, pela atenção, generosidade e confiança em mim, desde a graduação.

À minha filha, Mariana, e ao meu filho, João, por terem, pacientemente, me permitido viver essa aventura gigantesca que foi construir uma carreira acadêmica e que, agora, me recebem de volta para construir e reconstruir, em família, tantas coisas necessárias.

A Daniel Cabral, pela parceria, pelos desafios, desencontros e reencontros, e por ser, também, um porto para onde voltar.

À Maristelly Vasconcelos, minha irmã de sangue e alma, com quem compartilho tantas semelhanças, lutas e coragem.

À minha mãe, por me forjar uma mulher forte.

Aos amigos que permanecem ao meu lado e que não me permitem esquecer de quem realmente sou: Fabian Queiroz, William Leite, Rodolfo Araújo, Débora Freitas, Gabi Cavalcante, Pedro Gilberto, Débora Lima e Márcia Silva.

Aos colegas professores e professoras da AESA/ESSA e do EREFEM Monseñor José Kehrlé, com quem compartilho os sorrisos e as lágrimas do viver a educação superior e básica nesse país.

Aos inúmeros professores que tive e tenho na vida, que me ensinam sempre e acreditam em mim mais do que eu mesma. Em especial: Bebinha Gomes, Fabian Queiroz, Antônio Santos, Raquel Aragão, Ana Lisa Gomes, Cândido Ferraz, Adriano Bento, Leandro Camatti, Hercília Mello, Diórginis Ferreira, Francisco Amanajás.

Aos estudantes a quem ensino e que tanto me ensinam sobre todas as coisas, mas, principalmente, a não desistir dos sonhos e a olhar para minha trajetória com orgulho e certeza de um sonho realizado. Em especial, Vitória, Diego e Jonathan, pela confiança na orientação de seus trabalhos de conclusão.

A todas as pessoas que cruzaram a existência com a minha, com quem troquei, para quem ensinei e com quem aprendi sobre a vida e que me fizeram a pessoa que sou hoje – minhas armaduras e meus afetos.

A mim mesma, por ter sobrevivido a uma pandemia e à distância dos meus filhos, por ter construído e reconstruído quatro projetos (e a mim mesma) e, ainda assim, não ter desistido.

O caminho para tudo é a partilha.

***“Não se pode pagar pelas coisas mais do que elas valem”.***

(Prof. Dr. Fernando de Oliveira *apud* Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima-Silva,  
em algum dos muitos momentos valiosos da sua curta vida nessa terra).

## RESUMO

A L-Citrulina Malato (L-CM) tem sido utilizada para aumentar a vascularização pelo aumento dos níveis de NO e efeitos na sinalização metabólica oxidativa, mas não foram comparados os efeitos em músculos predominantemente oxidativos ou glicolíticos. Buscamos, então, compreender os efeitos da suplementação oral aguda de L-CM vs. L-Citrulina (L-C) sobre o metabolismo do NO e a regulação de genes angiogênicos (RNAm) no EDL e Sóleo de ratos. Randomizamos 48 ratos Wistar (210 dias/390±29g) em Controle (não suplementado), Veículo (água), L-C (170mg/kg) ou L-CM (256mg 2:1/ kg animal). Aos 90 e 270 minutos (min) pós ingestão, medimos os metabólitos plasmáticos e musculares de NO, e expressão dos genes NOS1, NOS3, HIF-1a e VEGF em amostras de EDL e sóleo. No plasma: L-C ou L-CM aumentou Nitrito aos 90 min (Controle: 0,93±0,16; Veículo: 1,14±0,16; L-C: 1,53±0,26; L-CM: 1,48±0,21[M]uM;  $p=0,0002$ ). No EDL, L-CM aumentou Nitrito aos 90 e 270min em relação ao Controle e Veículo (Controle: 3,73±1,26; Veículo: 4,47±1,30; L-C: 8,49±3,10; L-CM:13,0±8,91[M]uM;  $p=0,0146$ ) e Nitrato, aos 90min (Controle: 66,7±13,1; Veículo: 74,3±31,2; L-C: 152,0±26,8; L-CM: 206,0±53,9 [M]uM;  $p<0,0001$ ). Aos 270min, L-C ou L-CM aumentaram RxNO (Controle: 0,328±0,06; Veículo: 0,17±0,03; L-C: 0,292±0,186; L-CM: 0,286±0,06 [M]uM;  $p<0,0001$ ) e a expressão do gene NOS1 (Controle: 77,0±33,1 Veículo: 77,0±31,3; L-C: 90,2±17,9; L-CM: 168,0±20,4%;  $p=0,001$ ). No Sóleo: aos 270min, L-C ou L-CM aumentaram HIF-1a (Controle: 97,0±55,3; Veículo: 86,5; L-C: 179,1±76,7; L-CM: 191±36,1 ( $F(3,37)=3,040$ ;  $p=0,041$ ). Concluimos que a L-Citrulina Malato desencadeia efeitos diferentes em músculos de predominância glicolítica ou oxidativa: 1.No EDL (glicolítico) o metabolismo do NO e a expressão do gene para NOS1 são aumentados. 2. No Sóleo (oxidativo) não há alteração do metabolismo do NO e a adição de Malato não apresenta vantagem em relação à Citrulina isolada. Investigar os efeitos crônicos sobre a expressão de proteínas relacionadas à vasodilatação e angiogênese podem contribuir para uma possível utilização nutracêutica da L-Citrulina Malato.

**Palavras-chave:** genes angiogênicos; óxido nítrico sintases; suplementos vasodiladores.

## ABSTRACT

*L-Citrulline Malate (L-CM) has been utilized to enhance vascularization by increasing nitric oxide (NO) levels and influencing oxidative metabolic signaling. However, its effects have not been compared between predominantly oxidative and glycolytic muscles. This study aimed to investigate the acute effects of oral supplementation of L-CM versus L-Citrulline (L-C) on NO metabolism and the regulation of angiogenic gene expression (mRNA) in the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles of rats. Forty-eight Wistar rats (210 days old, 390±29g) were randomly assigned into four groups: Control (no supplementation), Vehicle (water), L-C (170 mg/kg), or L-CM (256 mg/kg, 2:1 ratio). At 90 and 270 minutes post-ingestion, plasma and muscle NO metabolites were measured, along with the expression levels of NOS1, NOS3, HIF-1 $\alpha$ , and VEGF in EDL and soleus samples. In plasma, L-C and L-CM increased nitrite levels at 90 minutes (Control: 0.93±0.16; Vehicle: 1.14±0.16; L-C: 1.53±0.26; L-CM: 1.48±0.21  $\mu$ M;  $p=0.0002$ ). In the EDL muscle, L-CM significantly increased nitrite at 90 and 270 minutes compared to Control and Vehicle (Control: 3.73±1.26; Vehicle: 4.47±1.30; L-C: 8.49±3.10; L-CM: 13.0±8.91  $\mu$ M;  $p=0.0146$ ) and elevated nitrate levels at 90 minutes (Control: 66.7±13.1; Vehicle: 74.3±31.2; L-C: 152.0±26.8; L-CM: 206.0±53.9  $\mu$ M;  $p<0.0001$ ). At 270 minutes, L-C and L-CM increased RxNO (Control: 0.328±0.06; Vehicle: 0.17±0.03; L-C: 0.292±0.186; L-CM: 0.286±0.06  $\mu$ M;  $p<0.0001$ ) and NOS1 gene expression (Control: 77.0±33.1; Vehicle: 77.0±31.3; L-C: 90.2±17.9; L-CM: 168.0±20.4%;  $p=0.001$ ). In the soleus muscle, at 270 minutes, both L-C and L-CM increased HIF-1 $\alpha$  expression (Control: 97.0±55.3; Vehicle: 86.5; L-C: 179.1±76.7; L-CM: 191±36.1;  $F(3,37)=3.040$ ;  $p=0.041$ ). The study concludes that L-Citrulline Malate exhibits differential effects depending on muscle fiber type: in the glycolytic EDL muscle, NO metabolism and NOS1 gene expression are significantly increased, whereas in the oxidative soleus muscle, NO metabolism remains unchanged, and malate supplementation does not provide additional advantages over isolated citrulline. Further investigation into chronic effects on vasodilation- and angiogenesis-related protein expression may contribute to potential nutraceutical applications of L-Citrulline Malate.*

**Keywords:** angiogenic genes; nitric oxide; nitric oxide synthases; vasodilator supplements.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Akt</b>                      | Proteína Quinase B                                    |
| <b>AMPK</b>                     | Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina |
| <b>ANOVA</b>                    | Análise de Variância                                  |
| <b>ATP</b>                      | Trifosfato de adenosina                               |
| <b>BH<sub>4</sub></b>           | Tetrahidrobiopterina                                  |
| <b>CAT</b>                      | Ciclo do ácido tricarboxílico                         |
| <b>CAV</b>                      | Centro Acadêmico de Vitória                           |
| <b>CEUA</b>                     | Comissão de Ética para Uso Animal                     |
| <b>COBEA</b>                    | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal           |
| <b>CONCEA</b>                   | Conselho Nacional de Controle de Experimentação Anima |
| <b>Ct</b>                       | Do inglês “Cycle Threshold”                           |
| <b>d</b>                        | Dias de vida  |
| <b>DTPA</b>                     | Ácido dietilenotriaminopentaacético                   |
| <b>e.p.m.</b>                   | Erro padrão da média                                  |
| <b>EDL</b>                      | Músculo extensor longo dos dedos                      |
| <b>EDTA</b>                     | Ácido etilenodiamino tetra-acético                    |
| <b>EG</b>                       | Expressão de genes                                    |
| <b>eNOS</b>                     | Óxido nítrico sintase endotelial                      |
| <b>FAD</b>                      | Dinucleotídeo de flavina e adenina                    |
| <b>FAK</b>                      | Quinase de adesão focal                               |
| <b>FCA</b>                      | Faculdade de Ciências Aplicadas                       |
| <b>fig.</b>                     | Figura  |
| <b>FMN</b>                      | Mononucleotídeo de flavina                            |
| <b>g</b>                        | Gramas  |
| <b>GMP<sub>c</sub></b>          | Monofosfato cíclico de guanosina                      |
| <b>GTP</b>                      | Trifosfato de guanosina                               |
| <b>H<sup>+</sup></b>            | Íons hidrogênio                                       |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Fator-1 $\alpha$ indutível por Hipóxia                |
| <b>iNOS</b>                     | Óxido nítrico sintase induzível                       |
| <b>kDa</b>                      | Quilodalton   |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>kg</b>                         | Quilograma  |
| <b>L</b>                          | Litro   |
| <b>LABDIME</b>                    | Laboratório de Distúrbios do Metabolismo  |
| <b>M</b>                          | Molar   |
| <b>Mir</b>                        | Miristoilação   |
| <b>Min</b>                        | Minutos   |
| <b>mL</b>                         | Mililitros  |
| <b>mM</b>                         | microMolar  |
| <b>mTOR</b>                       | Alvo Mamífero da Rapamicina   |
| <b>n</b>                          | Número de animais   |
| <b>NADP</b>                       | Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato   |
| <b>NADPH</b>                      | Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato reduzido  |
| <b>nm</b>                         | Nanômetro   |
| <b>nNOS</b>                       | Óxido nítrico sintase neuronal  |
| <b>NO</b>                         | Óxido nítrico   |
| <b>nº</b>                         | Número  |
| <b>NO<sub>2</sub></b>             | Nitrito   |
| <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> | Nitrato   |
| <b>NOS</b>                        | Óxido nítrico sintase (do inglês “ <i>nitric oxide synthase</i> ”)                            |
| <b>NOS1</b>                       | Óxido nítrico sintase tipo 1  |
| <b>NOS2</b>                       | Óxido nítrico sintase tipo 2  |
| <b>NOS3</b>                       | Óxido nítrico sintase tipo 3  |
| <b>° C</b>                        | Graus Celsius   |
| <b>PBS</b>                        | Tampão fosfato salino (do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ”)                        |
| <b>PDE5</b>                       | Inibidores da fosfodiesterase-5   |
| <b>PDS-95</b>                     | Proteína de densidade pós-sináptica 95 (do inglês “ <i>postsynaptic density protein-95</i> ”) |
| <b>PDZ</b>                        | Domínio PSD/Disc-Large/ZO-1 da óxido nítrico sintase tipo 1                                   |
| <b>pH</b>                         | Potencial Hidrogeniônico  |
| <b>PKG</b>                        | Proteínas quinases dependentes de GMPc  |
| <b>qPCR</b>                       | Reação em cadeia da polimerase em tempo real  |
| <b>RNA</b>                        | Ácido ribonucléico (do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ”)                                    |
| <b>RxNO</b>                       | Espécies reativas de nitrogênio   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>UFPE</b>    | Universidade Federal de Pernambuco        |
| <b>UNICAMP</b> | Universidade de Campinas                  |
| <b>USP</b>     | Universidade de São Paulo                 |
| <b>UV-Vis</b>  | Espectroscopia Ultravioleta-Visível       |
| <b>VEGF</b>    | Fator de crescimento endotelial vascular  |
| <b>x g</b>     | Multiplicado pela aceleração da gravidade |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|          |                                      |
|----------|--------------------------------------|
| <        | Menor que                            |
| ±        | Erro padrão para mais e para menos   |
| ®        | Marca registrada                     |
| μ        | Micro <sup>(10-6)</sup>              |
| °        | Grau                                 |
| α        | Letra do alfabeto grego - alfa       |
| Δ        | Símbolo grego Delta                  |
| *        | Diferente do grupo Controle          |
| #        | Diferente do grupo Veículo           |
| ε        | Diferente do grupo L-Citrulina       |
| <i>a</i> | Menor que o próprio grupo aos 90 min |
| <i>b</i> | Maior que o próprio grupo aos 90 min |



## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b> | Representação esquemática do aumento do fluxo sanguíneo em resposta à atividade muscular esquelética.....  | 26 |
| <b>Figura 2.</b> | Via funcional do NO no músculo liso.....   | 30 |
| <b>Figura 3.</b> | Visão geral dos genes que codificam as isoformas das NOS, sua estrutura funcional e regulação no músculo esquelético.....  | 33 |
| <b>Figura 4.</b> | Mecanismos de ação através dos quais substâncias e suplementos dietéticos fornecem NO - Via canônica (via das NO sintases) e Via alternativa (não dependentes das NO sintases) .....   | 40 |
| <b>Figura 5.</b> | Visão geral do desenho experimental do estudo.....   | 48 |
| <b>Figura 6.</b> | Efeitos da suplementação oral aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre as concentrações plasmáticas de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em ratos adultos.....  | 55 |
| <b>Figura 7.</b> | Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre as concentrações musculares de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e espécies nitrosiladas de óxido nítrico ( $\text{RxNO}^\bullet$ ) de ratos adultos.....        | 57 |
| <b>Figura 8.</b> | Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre a expressão dos genes que codificam as óxido nítrico sintases neuronal (NOS1) e endotelial (NOS3) no músculo de ratos adultos.....  | 58 |
| <b>Figura 9.</b> | Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre a expressão dos genes que codificam o Fator Induzido por Hipóxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) no músculo de ratos adultos.....        | 61 |
| <b>Figura 10</b> | Visão geral dos efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina Malato e mecanismos propostos sobre o metabolismo do óxido nítrico e a expressão de genes angiogênicos em músculos esqueléticos de ratos adultos com diferentes perfis de fibras predominantes..... | 70 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.1 Logística microvascular: interações demanda-oferta para as necessidades metabólicas do músculo esquelético .....</b> | <b>22</b> |
| <b>2.3 NO: mensageiro multifuncional do músculo esquelético .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>2.4 Síntese de NO no músculo esquelético.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>2.4 Substâncias e suplementos precursores do NO .....</b>  | <b>32</b> |
| <i>2.4.1 Substâncias precursoras do NO: via alternativa - independente das sintase...</i>                                   | <i>32</i> |
| <i>2.4.1 Suplementos precursores do NO: foco na via canônica .....</i>  | <i>33</i> |
| <i>2.4.1.1 L-Arginina.....</i>  | <i>33</i> |
| <i>2.4.1.2 L-Citrulina.....</i>   | <i>34</i> |
| <i>2.4.1.3 L-Citrulina Malato .....</i>   | <i>36</i> |
| <b>2.5 Malato: interação óxido nítrico, metabolismo energético e angiogênese no músculo esquelético.....</b>                | <b>39</b> |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>4 HIPÓTESES .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>5 MÉTODOS.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.1 Caracterização do estudo.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>5.2 Questões éticas.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>5.3 Local do estudo.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.4 Desenho experimental .....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.4 Procedimentos pré-experimentais.....</b>   | <b>47</b> |
| <i>5.4.1 Nivelamento das condições ambientais.....</i>  | <i>47</i> |

|   |            |
|---|------------|
| 5.4.2 Identificação, pesagem e randomização dos animais.....                          | 47         |
| <b>5.5 Procedimentos experimentais <i>in vivo</i> .....</b>                           | <b>47</b>  |
| 5.5.1 Aclimatação .....   | 47         |
| 5.5.2 Suplementação .....   | 48         |
| 5.5.4 Indução de morte .....  | 48         |
| <b>5.6 Procedimentos experimentais <i>post mortem</i> .....</b>                       | <b>49</b>  |
| 5.6.1 Coleta e preparação dos tecidos .....   | 49         |
| 5.6.1.1 Plasma .....  | 49         |
| 5.6.1.2 Músculo esquelético – Extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo .....            | 49         |
| 5.6.2 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico (NO) .....                       | 49         |
| <b>5.6.2.1 Quantificação das concentrações de nitrito .....</b>                       | <b>49</b>  |
| 5.6.6 Análise da expressão de genes .....   | 51         |
| 5.6.7 Análise estatística .....   | 51         |
| <b>6.1 Metabolismo do óxido nítrico.....</b>  | <b>53</b>  |
| 6.1.1 Nitrato e Nitrito plasmáticos.....  | 53         |
| 6.1.2 Nitrato, Nitrito e Espécies reativas de nitrogênio no músculo esquelético ..... | 54         |
| 6.1.3 Expressão de genes das sintases de Óxido Nítrico no músculo esquelético ...     | 56         |
| <b>6.2 Sinalização angiogênica.....</b>   | <b>58</b>  |
| <b>7 DISCUSSÃO.....</b>   | <b>61</b>  |
| <b>8 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>67</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>ANEXO A – PARECER CEUA UFPE 1 .....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>ANEXO B – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-CITRULINA .....</b>                        | <b>86</b>  |
| <b>ANEXO C – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-CITRULINA MALATO 2:1 ...</b>               | <b>889</b> |
| <b>APÊNDICE 1 – LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR.....</b>                      | <b>92</b>  |
| <b>APÊNDICE 2 – ARTIGO 1.....</b>   | <b>93</b>  |

## 1 INTRODUÇÃO

A vascularização tecidual ocorre por mecanismos de vasodilatação, vasoconstrição e alterações do fluxo sanguíneo e tem como objetivo fornecer as necessidades metabólicas teciduais (Hendrickse; Degens, 2019). Particularmente, a vasodilatação é controlada por meio do aumento das moléculas de adenosina e trifosfato de adenosina (ATP), prostaglandinas e produção de óxido nítrico (NO) (Joyner; Casey, 2015; Socha; Segal, 2018). O NO é uma molécula reativa de nitrogênio com radical diatômico estável e alta taxa de difusão em soluções salinas aquosas (Lancaster, 1997; Liu *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001; Zacharia; Deen, 2005) e lipídicas (Möller *et al.*, 2005; Zacharia; Deen, 2005), com elevada capacidade de difundir e propagar seu sinal através das membranas celulares (DeMartino *et al.*, 2019). No entanto, o tempo de vida do NO em ambiente biológico é muito limitado, devido à sua alta capacidade de reação com ânion superóxido (Kissner *et al.*, 1997), oxihemoglobina (Eich *et al.*, 1996) e oxigênio (Lewis; Deen, 1994). Essa característica faz com que a quantificação do NO nos tecidos seja normalmente realizada de forma indireta, através da quantificação de seus metabólitos nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Tsikas, 2005).

O NO é produzido principalmente pelas enzimas sintetizadoras de óxido nítrico (NOS), uma família de enzimas presentes em todos os mamíferos (Stuehr; Griffith, 1992). Estas enzimas são constituídas por quatro domínios proteicos, sendo dois catalíticos e dois regulatórios (Gantner; LaFond; Bonini, 2020). Os domínios catalíticos são compostos pelo domínio da oxigenase, com sítios para heme, tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ) e L-Arginina, onde ocorre a produção do NO, e o domínio da redutase, com sítios de ligação para NADPH, que serve como fonte de elétrons, e para os dois transportadores de elétrons - dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e mononucleotídeo de flavina (FMN) (Gantner; LaFond; Bonini, 2020). Os domínios regulatórios das NOS exibem diversidade entre as isoenzimas e são compostos por uma dobradiça oxigenase-redutase, que controla o fluxo de elétrons da redutase para o domínio da oxigenase, e o domínio PSD/Disc-Large/ZO-1 (PDZ), que altera a localização subcelular da enzima, presente em apenas uma das isoenzimas NOS (Gantner; LaFond; Bonini, 2020; Stuehr; Griffith, 1992). O processo é iniciado pelo NADPH, presente na redutase, que libera elétrons pela conversão a NADP. Os elétrons liberados reduzem o FAD, que doa elétrons para FMN. A produção de NO acontece na área da oxigenase: o grupo heme- $\text{BH}_4$  recebe elétrons do FMN e os repassa para o oxigênio molecular

que oxida a L-Arginina e a transforma em N-hidroxiarginina. A oxigenação desse composto intermediário o converte em L-Citrulina e libera NO (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Yokom *et al.*, 2014; Alderton, 2001 p.33). Nos rins, a L-Citrulina pode ser reconvertida a L-Arginina e realimentar a produção de NO.

Existem três isoformas de NOS: NOS1 (NOS neuronal), NOS2 (NOS induzível) e NOS3 (NOS endotelial) (González-Domenech; Muñoz-Chápuli, 2010). A NOS1 e NOS3 são as mais abundantes no músculo esquelético e são constitutivas, enquanto a NOS2 é induzível (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Hickner *et al.*, 2006; Percival, 2011). A regulação da atividade enzimática e da expressão dos genes NOS1 e NOS3 no músculo é altamente complexa, mediada por mecanismos que incluem a disponibilidade de substratos (DeMartino *et al.*, 2019), concentrações de cálcio, exercício físico (Baum; Huber-Abel; Flück, 2023), lesão (Filippin *et al.*, 2011), forças de cisalhamento (Baum *et al.*, 2004), dieta (Sansbury *et al.*, 2012), mecanismos de regulação transcricional, translacional e pós-traducional proteína-proteína (Stamler; Meissner, 2001), além do próprio produto, o NO (Abu-Soud; Rousseau; Stuehr, 1996; Connelly *et al.*, 2001).

Uma vez liberado no músculo esquelético, o óxido nítrico está envolvido em múltiplos processos, que vão desde a diferenciação celular (Blottner; Lück, 1998), reparo tecidual (Filippin *et al.*, 2011), metabolismo de substratos (Kalliokoski *et al.*, 2006), produção de energia, contração e produção de força (Kobzik *et al.*, 1994), biogênese mitocondrial (Nisoli *et al.*, 2004), resistência à fadiga (Moon *et al.*, 2017) e tem se configurado como um marcador importante para o envelhecimento e saúde (Poeggeler *et al.*, 2023). Os níveis de NO e NOS no músculo estão reduzidos em condições de obesidade (Bradley *et al.*, 2007), metabolismo alterado da glicose (Torres *et al. et al.*, 2004) e no envelhecimento (Casey; Ranadive; Joyner, 2015; Hickner *et al.*, 2003; Nyberg *et al.*, 2012).

Em humanos (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Dowling *et al.*, 2023; Murgia *et al.*, 2017; Dowling, 2023 p.534) e em animais (Piec *et al.*, 2005), tem-se observado redução funcional e morfológica das fibras de contração rápida, além de alterações no conteúdo e atividade das NOS paralelas ao processo de envelhecimento (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990). Essas alterações podem originar-se, em partes, em uma vascularização ineficiente (Gueugneau *et al.*, 2016) e em disfunções mitocondriais (Kumar *et al.*, 2021) que dificultam a manutenção fisiológica do músculo esquelético e apresentam ligação com as NOS (Baum; Huber-Abel; Flück,

2023; Baum *et al.*, 2013). O conteúdo de NOS1 é superior em músculos de contração rápida (Punkt *et al.*, 2006) e está reduzido no envelhecimento (Hord; Botchlett; Lawler, 2016). O conteúdo de NOS3 é mais elevado em músculos de contração lenta (Kobzik *et al.*, 1994; Stamler; Meissner, 2001) e está aumentado no envelhecimento humano (Cobley *et al.*, 2014), mas seu funcionamento parece comprometido (Sindler *et al.*, 2009). Alguns estudos têm elencado o consumo de substâncias que estimulem a produção de NO por vias dependentes e independentes das NOS (Bloomer *et al.*, 2010).

As evidências estabelecidas da relação entre o NO e o músculo esquelético (Morrison; Miller; Reid, 1998; Nickels *et al.*, 2007) têm levado a um crescente número de estudos utilizando substâncias que aumentem seus níveis endógenos e favoreçam funções fisiológicas relacionadas à vascularização adequada, manutenção da massa muscular e melhorias metabólicas que atuam sobre a saúde e desempenho do músculo esquelético (Wong *et al.*, 2023).

O NO atua também como um sensor para a diminuição da saturação de oxigênio nos tecidos (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2010; Jackson, 2016) e pode estimular moléculas sinalizadoras com função angiogênicas que também respondem à hipóxia. O HIF-1 $\alpha$ , um fator de transcrição no tecido muscular, envolvido na angiogênese, regeneração tecidual (Mason *et al.*, 2004), adaptação à hipóxia, e regula outro sinalizador angiogênico, o VEGF (Xie *et al.*, 2014; Ball *et al.*, 2012; Kasuno *et al.*, 2004). O NO estabiliza o HIF-1 $\alpha$  e modula sua expressão, além de regular o metabolismo celular. As funções angiogênicas do VEGF dependem de suprimento energético adequado e, apesar da glicólise ser fator fundamental para angiogênese, a oxidação de ácidos graxos aparece como um fator decisivo para o brotamento de novos vasos a partir de células do pedúnculo endotelial (Schoors *et al.*, 2015). Assim, o Malato, ao atuar como intermediário no ciclo do ácido cítrico, pode favorecer a bioenergética mitocondrial e contribuir indiretamente para a promoção da angiogênese, fornecendo energia essencial para processos celulares dependentes do metabolismo oxidativo.

Uma vez que a atividade e a expressão das NOS pode ser regulada por substratos e também pelo NO como produto, é relevante investigar o impacto da suplementação oral de L-Citrulina sobre o músculo esquelético. Assim como é importante identificar se a adição do Malato altera o metabolismo do NO. Outro ponto que se buscou elucidar nesse estudo é a compreensão de como o Malato atua sobre vias que favorecem a angiogênese, uma vez que, em células endoteliais, a ativação de vias oxidativas é necessária para a vascularização por novos vasos, mas não sabemos se

o comportamento é o mesmo em células musculares esqueléticas e se existem respostas diferentes em músculos com predominância de fibras musculares Tipo I ou Tipo II (Schoors *et al.*, 2015).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação oral aguda de L-Citrulina e L-Citrulina Malato em metabólitos musculares do NO e expressão dos genes NOS1, NOS3, HIF-1 $\alpha$  e VEGF dos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo de ratos. A hipótese é que a suplementação oral aguda com L-Citrulina Malato potencializa o aumento do metabolismo do óxido nítrico provocado pela L-Citrulina isolada e ativa vias de angiogênese no músculo esquelético de ratos adultos e que a sinalização angiogênica em músculos com composição predominante de fibras Tipo I, é mais responsiva à suplementação por L-Citrulina Malato que músculos com mais fibras tipo II.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O músculo esquelético atua como um regulador do metabolismo energético, assumindo condição de protagonista em condições de saúde, doença e nos processos relacionados ao envelhecimento. A sinergia entre a capacidade metabólica do músculo e a arquitetura microvascular demonstra uma complexa interação que ultrapassa os limites da vasodilatação e aponta para o óxido nítrico como um potencial sinalizador não apenas para o controle metabólico, mas também para a angiogênese.

Por outro lado, a L-Citrulina e a L-Citrulina Malato passaram a figurar como suplementos alimentares relacionados à vasodilatação, com foco no potencial adjuvante para o exercício, para a clínica e para a manutenção de condições metabólicas e musculares. Em seu intuito primário, buscava-se potencializar a hiperemia, e, com isso, aumentar a oferta de oxigênio e de substratos para o músculo esquelético, além de promover a redução dos metabólitos produzidos por ele, durante a contração, tendo como foco principal o fornecimento de óxido nítrico. Para além do efeito vasodilatador, possíveis efeitos metabólicos e de modulação da expressão de genes têm sido relatados com o uso da L-Citrulina e L-Citrulina Malato, que apontam para uma mediação do óxido nítrico, contudo, os mecanismos de ação ainda não foram elucidados.

Nesta revisão narrativa da literatura, abordaremos o papel do fluxo sanguíneo e da vascularização para o suprimento metabólico adequado ao músculo esquelético e a atuação do óxido nítrico como uma molécula sinalizadora multifacetada, com atuação sobre a vascularização muscular. Por fim, discutiremos as perspectivas do Malato como possível interventor nos processos de sinalização angiogênica.

### 2.1 Logística microvascular: interações demanda-oferta para as necessidades metabólicas do músculo esquelético

A homeostase depende de um fluxo sanguíneo apropriado para todos os tecidos corporais, segundo as exigências metabólicas de cada tecido (Calaresu; Faiers; Mogenson, 1975). A distribuição do fluxo sanguíneo corporal depende da pressão de perfusão (influenciada principalmente pela pressão arterial) e da resistência vascular (Calaresu; Faiers; Mogenson, 1975). A pressão arterial é regulada por sistemas de *feedback* que envolvem a ação nervosa autonômica e dos hormônios circulantes



como efetores (Magder, 2018). Já a resistência vascular, por outro lado, é influenciada de forma tecido-dependente pela atividade dos nervos vasomotores simpáticos, pelo nível de hormônios vasoativos circulantes e também por bioativos locais, incluindo metabólitos e fatores endoteliais (Joyner; Casey, 2015).

Desde o século 19, uma série de estudos têm sido conduzidos no intuito de compreender a regulação do fluxo sanguíneo (Barcroft, 1972; Golub; Pittman, 2013). Os estudos realizados pelo professor Kurt Kramer e seus colaboradores, na década de 30, já indicavam que o fluxo sanguíneo que irriga um músculo esquelético ativo é diretamente proporcional à sua taxa de consumo de oxigênio, em um modelo de músculo isolado de cães (Kramer; Obal; Quensel, 1939). Em 1967, ainda utilizando modelos caninos, Welch e Stainsby, também demonstraram essa relação direta entre o fluxo sanguíneo e a taxa de consumo de oxigênio. E foram além: comprovaram a existência de uma “dívida” de oxigênio - relativa à quantidade de oxigênio necessária para iniciar um exercício, mas que não estava disponível inicialmente, sendo compensada tão logo o exercício cessasse – esse débito também se relacionava diretamente às alterações no fluxo sanguíneo (Welch; Stainsby, 1967).

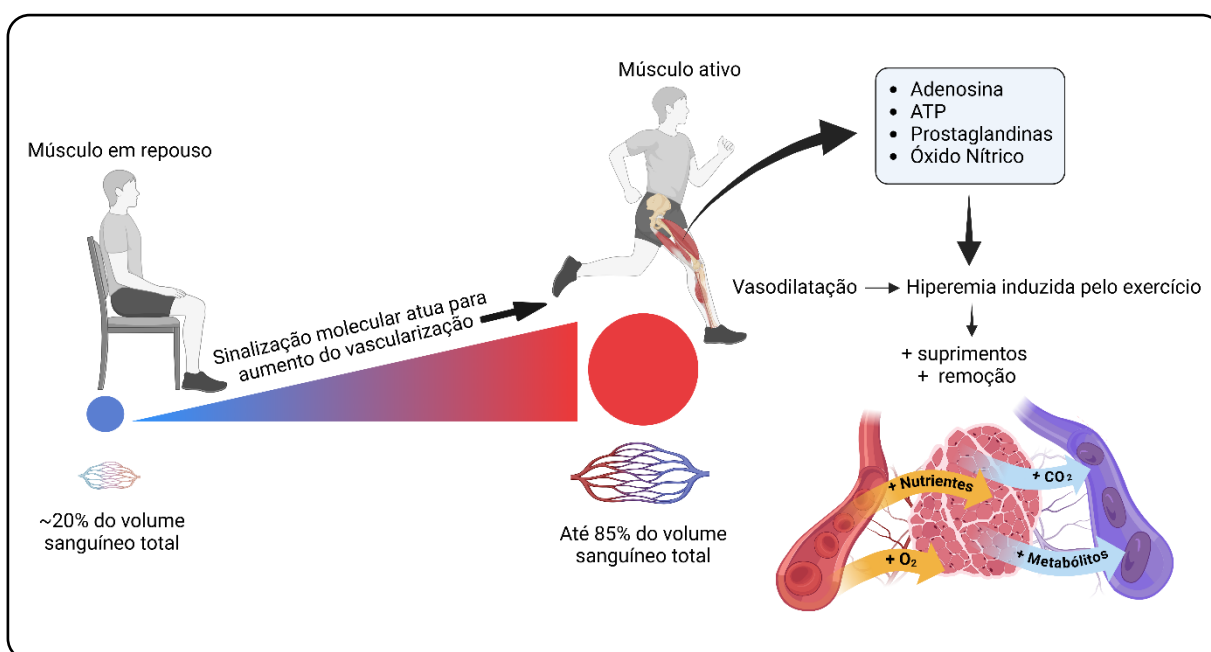
A importância da massa muscular relativa e da atividade do músculo esquelético para a saúde é amplamente reconhecida e a microcirculação do músculo esquelético desempenha um papel vital na saúde muscular, sua função e capacidade adaptativa. A distribuição e densidade dos capilares são cruciais para a oxigenação adequada dos músculos (Hudlicka, 2011 #8). A rarefação capilar pode ocorrer em condições como a insuficiência cardíaca crônica e pode preceder a sarcopenia, mas a estimulação da angiogênese pode aumentar a resposta hipertrófica (Lander-Ramos; Prior, 2018). Assim, compreender a relação entre microcirculação e sua relação com a adequação do suprimento metabólico podem apontar respostas para a melhoria da função muscular em doenças crônicas e envelhecimento.

O aumento das necessidades metabólicas do músculo esquelético, como ocorre durante a contração muscular, é acompanhado pelo aumento no débito cardíaco, para que as demandas metabólicas dos músculos e do coração sejam atendidas pelo fluxo sanguíneo (Clifford; Hellsten, 2004). Essa maior atividade metabólica em regiões ativas resulta em vasodilatação local por efeito direto de metabólitos e fatores endoteliais sobre a musculatura lisa vascular (Calaresu; Faiers; Mogenson, 1975; Laughlin; Armstrong, 1985). Este é um meio altamente eficiente de adequar o fluxo

sanguíneo sistêmico às demandas metabólicas locais, desde que a pressão de perfusão seja mantida em um nível apropriado.

De fato, o fluxo sanguíneo é alterado em função da contração muscular esquelética. Isso foi observado no exercício de preensão manual única (Corcondilas; Koroxenidis; Shepherd, 1964) e também em sequências de contração do quadríceps por movimentos de extensão unilaterais (Andersen *et al.*, 1985; Andersen; Henriksson, 1977; Andersen; Saltin, 1985; Joyner; Casey, 2015). Em conjunto, estes estudos conduzem para uma coordenação entre as necessidades metabólicas do músculo esquelético e a regulação do fluxo sanguíneo local (Joyner; Casey, 2015). A capacidade de aumentar o fluxo sanguíneo em resposta a contrações musculares esqueléticas é denominada hiperemia induzida pelo exercício e é sustentada por uma série de respostas fisiológicas que envolvem desde ajustes ventilatórios à sinalização microvascular, com o intuito de aumentar o fluxo e a capacidade de perfusão sanguínea nas células esqueléticas (Garten *et al.*, 2014; Joyner; Casey, 2015). A **figura 1** traz uma representação esquemática do aumento do fluxo sanguíneo em resposta à atividade muscular esquelética.

**Figura 1. Representação esquemática do aumento do fluxo sanguíneo em resposta à atividade muscular esquelética**



**FONTE:** Elaborada pela autora (2024). O<sub>2</sub>: Oxigênio; CO<sub>2</sub>: Gás carbônico.

A resposta vasodilatadora periférica que provoca a hiperemia, apesar de exaustivamente estudada, ainda possui mecanismos difusos. Vários bioativos foram

considerados como protagonistas da hiperemia. Na década de 1970, as prostaglandinas figuraram como possíveis mediadores principais, a partir de um estudo conduzido por Bevegård e Oro, a infusão de prostaglandinas na artéria braquial aumentou o fluxo sanguíneo (Bevegård; Orö, 1969). O mesmo efeito foi observado em estudos posteriores (Frandsen; Bangsbo; Langberg; Saltin *et al.*, 2000; Wilson; Kapoor, 1993). Os avanços que possibilitaram o bloqueio das ciclooxigenases permitiram observar que havia uma relação compensatória entre a ação vasodilatadora das prostaglandinas e do NO, uma vez que o fluxo sanguíneo só era significativamente reduzido quando as ciclooxigenases e as NO sintases foram simultaneamente bloqueadas (Mortensen *et al.*, 2007; Schrage *et al.*, 2010). Esses estudos trouxeram ideias importantes para a possível relação NO-prostaglandinas-ATP e colocaram o endotélio no papel de mediador principal das respostas que levam à vasodilatação.

As células endoteliais são as primeiras a detectar alterações no interior e exterior dos vasos sanguíneos, incluindo mudanças na velocidade do fluxo e alterações metabólicas nas fibras musculares circundantes (Hudlicka, 2011). As mudanças na vascularização podem ocorrer a partir de mecanismos de vasodilatação, vasoconstrição e por mudanças no fluxo de hemácias no local das arteríolas que irrigam o músculo (Socha; Segal, 2018). Também podem ocorrer através do aumento da produção de moléculas de adenosina e trifosfato de adenosina, prostaglandinas e da produção de NO pela atividade das NOS (Joyner *et al.*, 2015).

A insulina também atua como vasodilatador e distúrbios na sua sinalização, como a resistência à insulina no músculo esquelético, tendo um papel crítico na gênese das complicações vasculares diabéticas (Wagenmakers *et al.*, 2016). Nas complicações macrovasculares diabéticas, a patologia se centra na biodisponibilidade reduzida do NO, hiperpolarizações dependentes de prostaciclina e aumento da produção ou ação de vasoconstritores derivados do endotélio (Shi; Vanhoutte, 2017). A disfunção endotelial nas complicações microvasculares decorrentes do diabetes é caracterizada principalmente pela diminuição da liberação de NO, aumento do estresse oxidativo, aumento da produção de fatores inflamatórios, angiogênese anormal e comprometimento do reparo endotelial (Suresh e Reddy, 2021). Para além do metabolismo de glicose, a hipercolesterolemia demonstrou também prejudicar a vasodilatação endotélio-dependente devido a falhas na biodisponibilidade do óxido nítrico (Padró; Vilahur; Badimon, 2018). Os estudos que abordam a relevância do fluxo sanguíneo para a saúde ou para a doença, seja considerando a maquinaria vascular de

forma isolada, seja incluindo sua interação com o músculo esquelético, têm evidenciado o óxido nítrico como um importante mediador na logística microvascular para o suprimento metabólico no músculo esquelético.

### **2.3 NO: mensageiro multifuncional do músculo esquelético**

Em 1980, uma série de experimentos, demonstrou que algumas tiras aórticas de coelho permaneciam contraídas em resposta à acetilcolina, caso suas superfícies íntimas não fossem cuidadosamente preservadas. Quando a manipulação da aorta permitia a preservação da camada íntima, a infusão de acetilcolina induzia ao relaxamento do músculo liso. Assim, Furchgot e Zawadzki perceberam que o relaxamento do músculo liso era mediado pelas células endoteliais. Esse relaxamento parecia provocado pelo que, na época, foi denominado como “fator relaxante derivado do endotélio” (Furchgott, 1983; Furchgott; Zawadzki, 1980). O fator relaxante derivado do endotélio, identificado na ocasião, seria posteriormente denominado óxido nítrico, e caracterizado como uma molécula de sinalização, com capacidade para efetivar a comunicação entre células endoteliais e células musculares lisas nos vasos sanguíneos (Félétou; Köhler; Vanhoutte, 2012; Furchgott, 1998; 1999; Ignarro, 1989; Moncada; Palmer; Higgs, 1988). Além da sinalização vascular, o óxido nítrico tem sido relacionado à sinalização em um grande número de processos intracelulares, que reúne milhares de publicações e revisões a respeito de seus efeitos biológicos (Golub; Pittman, 2013).

O óxido nítrico é uma molécula reativa de nitrogênio, produzida principalmente por enzimas sintetizadoras de óxido nítrico – as NOS, através da conversão de L-Arginina a L-Citrulina, com participação de cofatores e oxigênio pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Stamler; Meissner, 2001). Como um radical diatômico estável com alta taxa de difusão em soluções aquosas, salina (Lancaster, 1997; Liu *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001; Zacharia; Deen, 2005), e lipídica (aumentada aproximadamente cinco vezes em relação aos valores da água) (Möller *et al.*, 2005; Zacharia; Deen, 2005), o óxido nítrico é capaz de se difundir e propagar seu sinal rápida e facilmente através das membranas celulares.

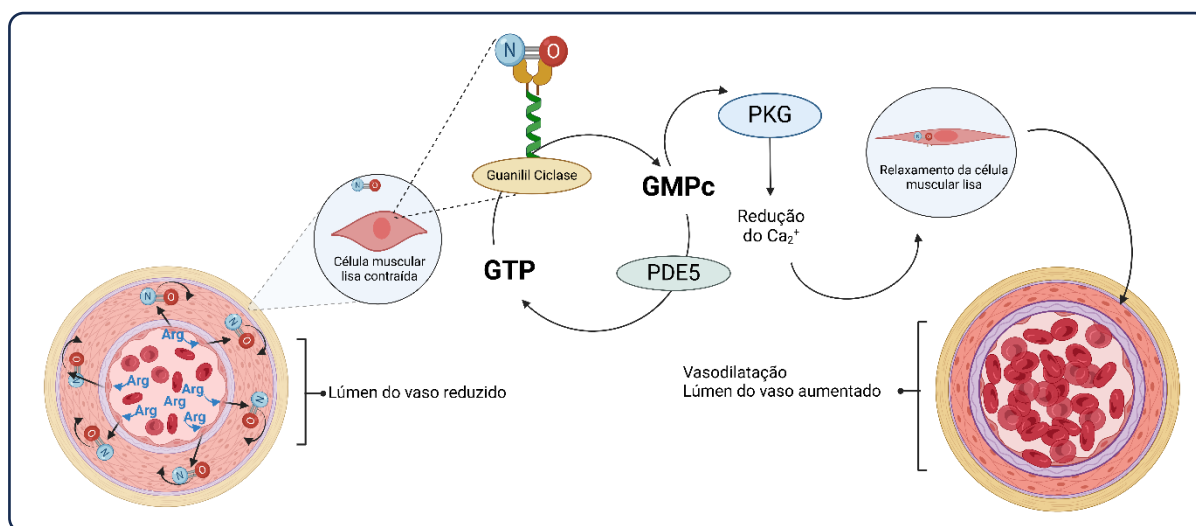
Assim como uma alta difusão, a vida útil do óxido nítrico no meio biológico é muito limitada, devido à imensa capacidade de reação com ânions superóxidos (Kissner *et al.*, 1997), com oxiemoglobina (Eich *et al.*, 1996) e com o oxigênio (Lewis;

Deen, 1994). A concentração de óxido nítrico nos tecidos assume valores dinâmicos que são influenciados por múltiplos estímulos, mas que são comumente relatados na faixa entre 0,1 e 5 nanomolar (Hall; Garthwaite, 2009). Essa característica faz com que sua quantificação nos tecidos seja normalmente realizada de forma indireta, comumente realizada via quantificação de nitrito e nitrato – substâncias nas quais ele é oxidado rapidamente nos tecidos (Tsikas, 2005), e que podem também (re)produzir óxido nítrico por redução, em vias independentes das NOS (Lorenzo Calvo *et al.*, 2020)

A capacidade do óxido nítrico de ativar o mensageiro celular guanilato ciclase solúvel e, dessa forma, aumentar a taxa de produção do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) nas células tem sido demonstrada como um caminho para ação do óxido nítrico (Arnold *et al.*, 1977). No citoplasma das células endoteliais, a molécula de óxido nítrico se liga de forma reversível a uma heme da guanilato ciclase solúvel, desencadeando assim o aumento da geração de GMPc a partir de moléculas de guanosina trifosfato (Arnold *et al.*, 1977; Krumenacker; Hanafy; Murad, 2004). Por sua vez, o GMPc interage com proteínas que promovem efeitos específicos em proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG). Uma vez ativadas, as PKGs influenciam a atividade contrátil das células musculares lisas pela fosfatase da cadeia leve da miosina, reduzindo assim o tônus muscular liso (Wang *et al.*, 2004).

O principal resultado do aumento do nível intracelular do GMPc é a ativação de vias de sinalização que levam à redução das concentrações plasmáticas de cálcio, causada pela liberação de potássio através dos grandes canais de condutância, seguida pela hiperpolarização da membrana celular muscular lisa, por fechamento dos canais de cálcio regulados por tensão (Kvietys; Granger, 2012; Tanaka *et al.*, 2004). A cascata de eventos desencadeada pelo óxido nítrico através da sinalização da GMPc culmina no relaxamento das células musculares lisas com consequente alargamento passivo do lúmen arteriolar, o que colabora, em partes, para o aumento do fluxo sanguíneo local. Pelas suas características de difusão e interação, o óxido nítrico parece ser um interlocutor eficiente para a regulação local do fluxo sanguíneo na microcirculação, capaz de integrar sinais de múltiplas fontes nas artérias terminais. A **figura 2** apresenta um desenho esquemático do processo das vias funcionais do NO no músculo liso.

**Figura 2. Via funcional do NO no músculo liso**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Arg: Arginina; NO: Óxido nítrico; GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina; PKG: Proteínas quinases dependentes de GMPc;  $Ca^{2+}$ : Cálcio; PDE5: Inibidores da fosfodiesterase-5; GTP: Trifosfato de guanosina.

No músculo esquelético, uma vez liberado, o óxido nítrico está envolvido em múltiplos processos que vão desde a diferenciação celular (Blottner; Lück, 1998), reparo tecidual (Filippin *et al.*, 2011), metabolismo de substratos (Kalliokoski *et al.*, 2006), produção de energia, contração e produção de força (Kobzik *et al.*, 1994), biogênese mitocondrial (Nisoli *et al.*, 2004) e resistência à fadiga (Moon; Balke; Madorma; Siegel *et al.*, 2017), além de se configurar como um marcador importante para o envelhecimento e saúde (Poeggeler *et al.*, 2023). Os níveis de NO e NOS, no músculo esquelético, estão reduzidos em condições de obesidade (Bradley *et al.*, 2007), metabolismo prejudicado da glicose (Torres; De Sanctis; de Briceno; Hernandez *et al.*, 2004) e envelhecimento (Casey; Ranadive; Joyner, 2015; Hickner *et al.*, 2003; Nyberg *et al.*, 2012).

## 2.4 Síntese de NO no músculo esquelético

Três isoformas de NOS são expressas no músculo esquelético, comumente conhecidas como NOS neuronal (NOS1/nNOS), NOS induzível (NOS2/iNOS) e NOS endotelial (NOS3/eNOS) (Stamler; Meissner, 2001), contudo a NOS1 e NOS3 são as mais abundantes nesse tecido e são constitutivas, enquanto a NOS2 é induzível (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Hickner *et al.*, 2006; Percival, 2011). As NOS são

constituídas por quatro domínios proteicos, sendo dois catalíticos e dois regulatórios (Gantner; LaFond; Bonini, 2020).

Os domínios catalíticos das NOS são compostos pelo domínio da oxigenase, com sítios para heme, BH<sub>4</sub> e L-Arginina, onde ocorre a produção do NO, e o domínio da redutase, com sítios de ligação para o NADPH, que serve como fonte de elétrons, e para os dois transportadores de elétrons FAD e FMN (Gantner; LaFond; Bonini, 2020). Os domínios regulatórios das NOS exibem diversidade entre as isoenzimas e são compostos por uma dobradiça oxigenase-redutase, que controla o fluxo de elétrons da redutase para o domínio da oxigenase, e o domínio PSD/Disc-Large/ZO-1 (PDZ), que altera a localização subcelular da enzima e que está presente apenas na NOS1 (Gantner; LaFond; Bonini, 2020; Stuehr; Griffith, 1992).

A atividade enzimática das NOS é iniciada pelo NADPH, presente na redutase, que libera elétrons pela conversão a NADP. Os elétrons liberados reduzem o FAD, que doa elétrons para FMN. A produção de NO acontece na área da oxigenase: o grupo heme-BH<sub>4</sub> recebe elétrons do FMN e os repassa para o oxigênio molecular que oxida a L-Arginina e a transforma em N-hidroxiarginina. A oxigenação desse composto intermediário o converte em L-Citrulina e libera NO (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Yokom *et al.*, 2014). Nos rins, a L-Citrulina pode ser reconvertida a L-Arginina e realimentar a produção de NO (Bahadoran *et al.*, 2021).

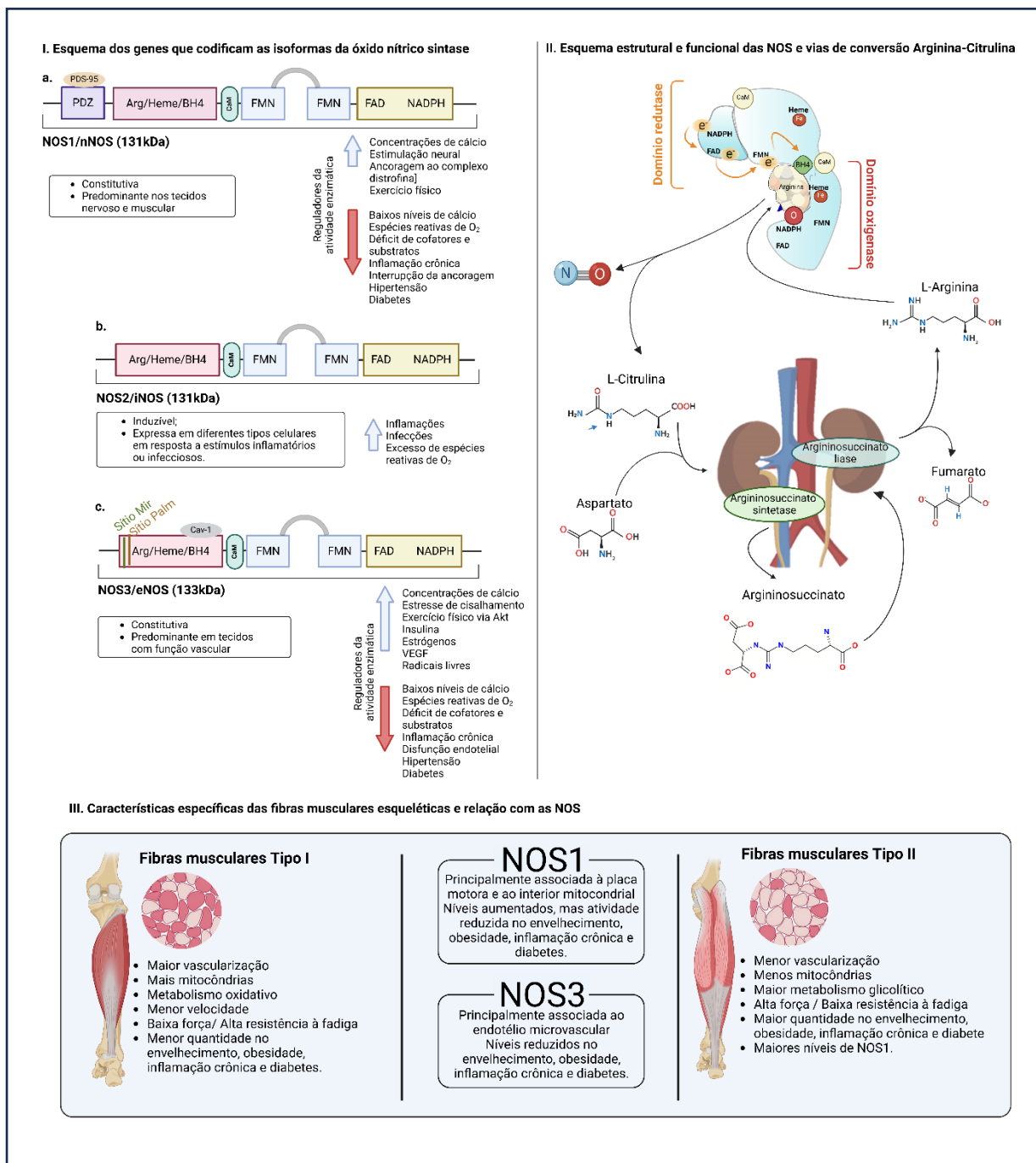
A regulação da atividade enzimática e da expressão dos genes NOS1 e NOS3 no músculo é altamente complexa, mediada por mecanismos que incluem a disponibilidade de substratos (DeMartino *et al.*, 2019), concentrações de cálcio, exercício físico (Baum; Huber-Abel; Flück, 2023), lesão (Filippin *et al.*, 2011), forças de cisalhamento (Baum *et al.*, 2004), dieta (Sansbury *et al.*, 2012), mecanismos de regulação transcricional, translacional e pós-traducional proteína-proteína (Stamler; Meissner, 2001), além do próprio produto, o NO (Abu-Soud; Rousseau; Stuehr, 1996; Connelly *et al.*, 2001).

O conteúdo de NOS1 é superior em músculos de contração rápida, com predomínio do metabolismo glicolítico (Punkt *et al.*, 2006), enquanto o conteúdo de NOS3 é mais elevado em músculos de contração lenta, onde predomina o metabolismo oxidativo (Kobzik *et al.*, 1994; Stamler; Meissner, 2001). Em humanos e em animais tem-se observado redução funcional e alterações tanto no conteúdo, quanto na atividade das NOS decorrentes do envelhecimento (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990). Essas alterações podem originar-se, em partes, em uma

vascularização ineficiente (Gueugneau *et al.*, 2016) e em disfunções mitocondriais (Kumar *et al.*, 2021) que dificultam a manutenção fisiológica do músculo esquelético e apresentam ligação com as NOS (Baum; Huber-Abel; Flück, 2023; Baum *et al.*, 2013). De forma anacrônica, enquanto o conteúdo de NOS1 está reduzido (Hord; Botchlett; Lawler, 2016), o de NOS3 está aumentado no envelhecimento humano (Cobley *et al.*, 2014), mas sua atividade parece disfuncional, uma vez que níveis reduzidos de NO e seus precursores são observados no envelhecimento (Moaddel *et al.*, 2024). Identificar substâncias que aumentem a disponibilidade de óxido nítrico e melhorem o metabolismo energético têm sido alvo de estudos. A **figura 3** apresenta uma visão geral dos genes que codificam as NOS, estrutura funcional e regulação das NOS no músculo esquelético.



**Figura 3. Visão geral dos genes que codificam as isoformas das NOS, sua estrutura funcional e regulação no músculo esquelético**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** PDZ: Domínio PSD/Disc-Large/ZO-1 da NOS1; PDS-95: Proteína de densidade pós-sináptica 95; Arg: Arginina; BH4: Tetrahidrobiopterina; CaM: Calmodulina; FMN: Mononucleotídeo de flavina; FAD: Dinucleotídeo de flavina e adenina; NADPH: Dinucleotídeo de adenina fosfato reduzido; NOS1/nNOS: Óxido nítrico sintase 1/neuronal; kDa: Quilodalton; Mir: Mistoilação; Palm: Palmitoilação; Cav-1: Caveolina-1; NOS2/iNOS: Óxido nítrico sintase 2/induzível; NOS3/eNOS: Óxido nítrico sintase 3/endotelial; Akt: Proteína quíase B; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; Fe: Ferro; e<sup>-</sup>: Eletron.

## 2.4 Substâncias e suplementos precursores do NO

Está bem esclarecido que o relaxamento do músculo liso vascular favorece a irrigação sanguínea tecidual, seja em repouso ou durante o exercício (Lorin *et al.*, 2014), visto que a vasodilatação reflexa provocada é proporcional aos níveis de óxido nítrico e se relaciona positivamente com as concentrações plasmáticas de L-arginina (Jones *et al.*, 2020). Nesse contexto, alguns compostos e substâncias dietéticas passaram a ser utilizados com o objetivo de potencializar a vasodilatação (Sureda; Pons, 2012), no intuito de fornecer precursores exógenos para aumentar a síntese do óxido nítrico e, dessa forma, potencializar a hiperemia, buscando-se aumentar a oferta de oxigênio e de substratos para o músculo esquelético (Bescóset *al.*, 2012).

Entre as substâncias conhecidas por possível ação vasodilatadora estão o Nitrato, a L-Arginina (seu precursor metabólico direto), a L-Citrulina e o composto L-Citrulina Malato (Huerta Ojeda *et al.*, 2019). Enquanto o Nitrato tem sido visto com cautela como suplemento alimentar, uma vez que seu uso tem se relacionado com o desenvolvimento de resistência vascular de médio e longo prazo (Daiber; Münzel, 2015; McVeigh *et al.*, 2002; Milone *et al.*, 1999), as demais substâncias têm sido estudadas com potencial efeito de incremento sobre a vasodilatação. Seu uso, seja como vasodilatador para a clínica ou para melhoria da hiperemia induzida pelo exercício, ainda não possui consenso (Sureda; Pons, 2012).

### 2.4.1 Substâncias precursoras do NO: via alternativa - independente das sintase

O Nitrato e Nitrito são os principais substratos para produção de NO por vias não dependentes das NOS (Lorenzo Calvo, *et al.*, 2020). O Nitrato pode ser reduzido a Nitrito e depois a NO no organismo, assim como a oxidação do NO gera nitrito, nitrato e espécies reativas de nitrogênio (Sparacino-Watkins; Lai; Gladwin, 2012). Uma série de publicações do último século, relacionando o nitrato-nitrito e espécies reativas de nitrogênio ao desenvolvimento de câncer, trouxeram incerteza a respeito da segurança do consumo para humanos (Issenberg, 1976; Sander, 1971; 1973). Contudo, nos últimos anos, novas investigações têm apontado a necessidade de pesquisas mais profundas, uma vez que efeitos benéficos têm sido relatados, principalmente sobre a saúde cardiovascular (Bondonno; Croft; Hodgson, 2016; Hord, 2011).

Embora eficiente, o uso crônico de nitrato inorgânico tem sido também relacionado ao desenvolvimento de tolerância e disfunção endotelial (Daiber; Münzel, 2015; McVeigh *et al.*, 2002; Milone *et al.*, 1999). O músculo esquelético, no entanto, demonstrou ser um reservatório de nitrato, influenciado tanto pela ingestão aumentada quanto pela escassez de nitrato dietético, para alimentar as necessidades fisiológicas de nitrito/óxido nítrico por vias não canônicas (Gilliard *et al.*, 2018). Esse efeito pode estar ligado à limitação da produção de NO em condições de baixa concentração de oxigênio, via NOS (Jones *et al.*, 2021), e coloca em evidência a relevância fisiológica das inúmeras vias ativadas pelo NO como bioativo.

De fato, ainda há controvérsias na literatura científica a respeito do consumo de nitrato dietético. Inclusive, a capacidade de absorção real do nitrato dietético tem demonstrado dependência de uma série de relações equilibradas entre a boca, o microbioma oral e intestinal, a circulação sanguínea e a célula muscular esquelética, que necessita de aprofundamento em sua compreensão (Jones *et al.*, 2021). Pesquisas robustas são necessárias para conduzir a uma avaliação confiável entre os riscos e benefícios da suplementação dietética de nitrito e/ou nitrato para a saúde humana em termos de consequências de longo prazo, até que a recomendação de uso crônico seja um consenso (Habermeyer *et al.*, 2015).

#### 2.4.1 Suplementos precursores do NO: foco na via canônica

##### 2.4.1.1 L-Arginina

A L-Arginina é um aminoácido funcional, considerado semiessencial, uma vez que o próprio corpo é capaz de produzi-lo, mas ele também pode ser ingerido através da dieta. Além de sua função como bloco de construção proteico, a L-Arginina atua na síntese da creatina, poliaminas, homoarginina e também de NO em mamíferos. A Arginina e seus metabólitos têm um importante papel no metabolismo ativo do ciclo da ureia, contribuindo assim para desintoxicar a amônia produzida nos processos fisiológicos (Hanff *et al.*, 2018).

Em estudos com culturas celulares, a infusão de L-Arginina foi capaz de modular a expressão de importantes reguladores metabólicos relacionados à saúde da musculatura esquelética, como reguladores chave da biogênese mitocondrial, genes

codificadores para o complexo mitocondrial I, produção de NO mitocondrial e para a velocidade de consumo de oxigênio (Gambardellai *et al.*, 2021). Outros estudos com cultura demonstraram que a L-Arginina é capaz de ativar a via do alvo celular da rapamicina em mamíferos (mTOR) e vias de sinalização celular quinase de adesão focal em mamíferos (FAK), o que estimula a síntese de proteínas (Wang *et al.*, 2018), bem como aumentar a fosforilação da AMPK e a oxidação de substratos energéticos no tecido muscular energético (Jobgen; Wu, 2022).

Uma metanálise conduzida com foco na suplementação oral de L-Arginina em adultos saudáveis, identificou aumento no consumo máximo de oxigênio associado à suplementação (Rezaei *et al.*, 2021). Já em um ensaio clínico randomizado, transversal, duplo-cego, controlado por Veículo, 30 adultos, sendo 15 homens e 15 mulheres, foram suplementados com 3g de L-Arginina ou Veículo, e submetidos a uma série de exercícios resistidos de flexão do cotovelo. Foram avaliadas a dilatação mediada por fluxo, indicadores cardiovasculares de frequência e variabilidade cardíaca e o desempenho durante o exercício: nenhuma alteração relacionada à suplementação foi observada no músculo esquelético ou nas variáveis cardiovasculares analisadas (Streeter *et al.*, 2019).

Os experimentos *in vitro* demonstram efeitos que não encontram consenso na clínica. Uma das razões para as divergências identificadas pode estar na baixa biodisponibilidade da L-Arginina via ingestão oral, forma mais comum de administração relatada. Quando administrada de forma oral, a L-Arginina é submetida a processos metabólicos intensos, que vão desde a digestão por bactérias e arginases do trato intestinal (que absorvem algo em torno de 40% da substância ingerida) até uma alta metabolização hepática (Böger, 2014). Ao final do processo metabólico, apenas 1%, aproximadamente, da L-Arginina consumida é biodisponibilizada na corrente sanguínea (Böger, 2014). Doses maiores, em ordem superior a 9g, tem demonstrado ocasionar efeitos gastrointestinais indesejáveis (Grimble, 2007), o que parece tornar seu uso como suplemento agudo pouco viável.

#### 2.4.1.2 L-Citrulina

A L-Citrulina é um aminoácido neutro, semi-essencial (Papadia *et al.*, 2018) encontrado abundantemente na melancia (*Citrulus lantus*) - 3ª fruta mais produzida no território brasileiro, que tem a região Nordeste como a maior produtora nacional

(Comas, 2021), enquanto o Brasil figura como o 4º maior produtor mundial (Maps, 2018). A L-Citrulina é encontrada tanto na casca quanto na polpa da melancia e tem sido estudada como potencial nutracêutico (Papadia *et al.*, 2018).

Como bioativo, a L-Citrulina é um componente importante do ciclo da ureia. No rins, atua como precursor da L-Arginina e tem sido estudada como seu substituto mais promissor para suplementação, uma vez que não apresenta metabolismo intestinal importante (seja por bactérias ou arginases) e tem metabolismo hepático irrelevante, o que aumenta significativamente sua biodisponibilidade (Bahri *et al.*, 2013). Estas características permitem que aproximadamente 99% da L-Citrulina ingerida oralmente seja disponibilizada na circulação sistêmica e possa ser absorvida pelos tecidos alvo e, assim, convertida a L-Arginina (Bahri *et al.*, 2013).

Quando ingerida oralmente, a L-Citrulina aumenta mais significativamente os níveis sistêmicos de L-Arginina do que a suplementação de L-Arginina *per se*, e demonstra exercer efeito mais pronunciado sobre a vasodilatação (Trexler *et al.*, 2019). Em humanos, uma dose aguda contendo 8g de L-Citrulina aumentou o fluxo sanguíneo de voluntários jovens, fisicamente ativos, durante o repouso, mas na hiperemia reativa, esse achado não foi significativo (Rogers; Gills; Gray, 2020).

Um estudo utilizou *C. elegans* e camundongos idosos para avaliar marcadores de senescência e inflamação em resposta à suplementação com L-Citrulina, e identificaram que o consumo de 5mM e 2,5 g / kg de peso animal / dia, respectivamente, pode estender a expectativa de vida saudável em *C. elegans* e o metabolismo da glicose em camundongos envelhecidos (Rajcic *et al.*, 2023). Os resultados sugerem que, em condições de envelhecimento saudável, a suplementação de L-Citrulina pode reduzir processos degenerativos associados ao envelhecimento.

Ao mesmo tempo que estudos reportam resultados significativos, outros não relatam efeitos diferenciais. Em um estudo conduzido com idosos fisicamente ativos, o consumo de 10g de L-Citrulina não aumentou o fluxo sanguíneo, a circulação microvascular ou a síntese de proteínas miofibrilares em repouso ou após exercício, em comparação com a ingestão de aminoácidos não essenciais, sobre as mesmas condições (Churchward-Venne *et al.*, 2014). Já em mulheres idosas hipertensas, na pós-menopausa, o consumo de 10g de L-Citrulina indicou melhoria na função endotelial e pressão arterial (Maharaj *et al.*, 2022). Contudo, no referido estudo, não foram utilizados aminoácidos não essenciais para comparação e o protocolo de administração foi crônico, executado por 30 dias.

É possível observar que resultados significativos são mais reportados em estudos de consumo crônico, o que aponta para possível ativação de vias que dependem de modificações na expressão de genes e proteínas, e não apenas na atividade enzimática ou de transportadores. A falta de evidências em relação a um fluxo sanguíneo mais aumentado durante a atividade muscular esquelética ou em repouso, em protocolos agudos, parece apontar para uma ação coordenada que é estimulada não só pela vasodilatação, mas, talvez, por um eixo de sinalização microvasculatura-maquinaria metabólica muscular relacionada não apenas ao NO, mas também à angiogênese.

#### 2.4.1.3 L-Citrulina Malato

Desenvolvida mais recentemente, a L-Citrulina Malato une a L-Citrulina ao ânion Malato - um intermediário do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT), com o objetivo de aumentar a velocidade do metabolismo aeróbio e reduzir a produção de ácido láctico (Cunniffe *et al.*, 2016). Parecendo mais promissora que a L-Citrulina isolada, sugeriu-se que a L-Citrulina Malato atuaria então sobre dois mecanismos importantes relacionados à saúde cardiovascular, metabólica e ao desempenho. Em 1º lugar, a L-Citrulina Malato incrementaria a vasodilatação, mediada pela conversão da L-Citrulina em L-Arginina e produção de NO (Rogers; Gills; Gray, 2020) - dessa forma, o fluxo sanguíneo para o músculo seria aumentado e, conseqüentemente, mais suprimento energético e de oxigênio seria alcançado, além de maior remoção de metabólitos. Em 2º lugar, a adição do ânion Malato poderia favorecer mais o metabolismo oxidativo via fornecimento direto do intermediário Malato ao CAT (Bendahan *et al.*, 2002).

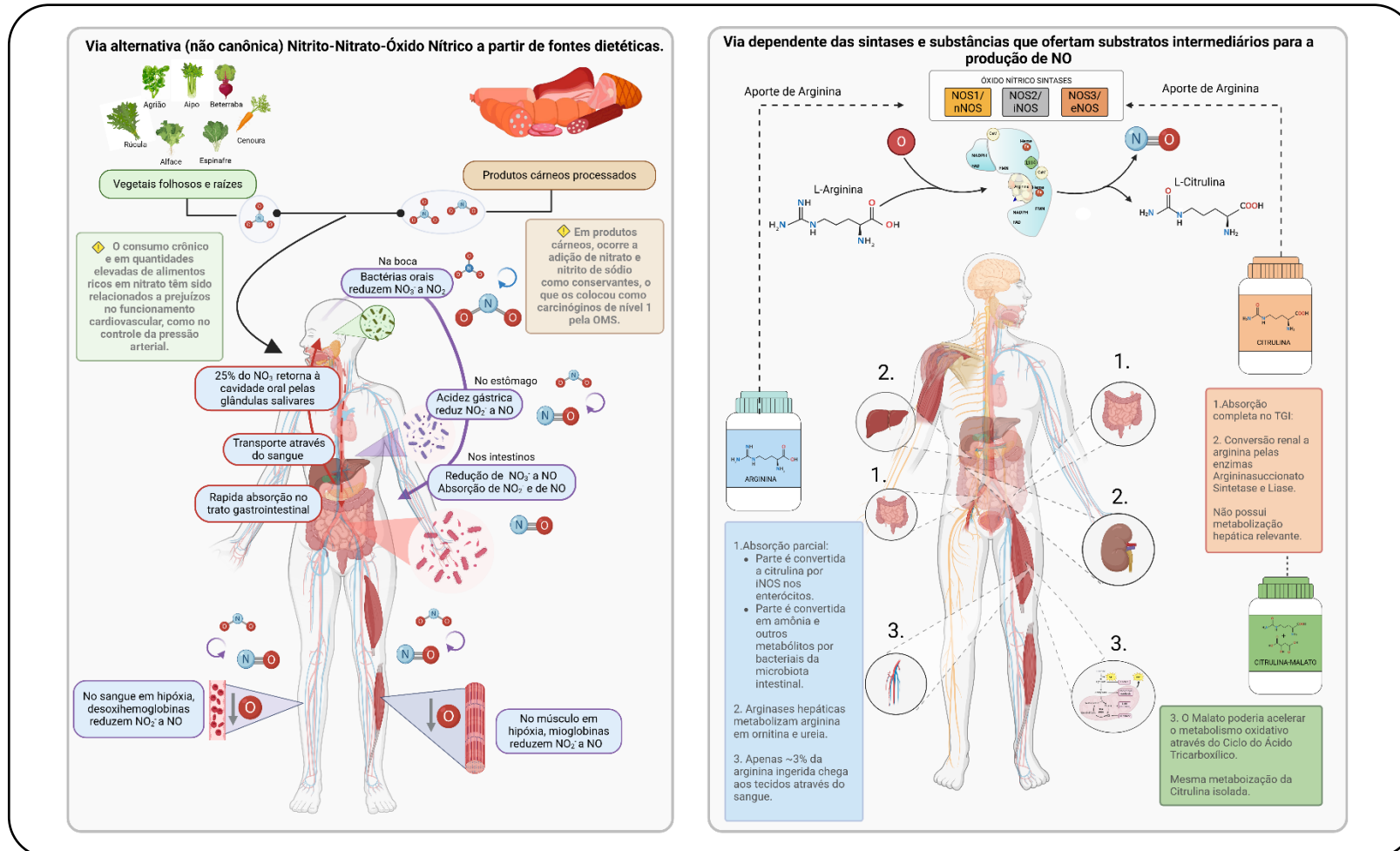
Compondo o produto da 7ª reação do CAT, o passo final para geração do Cítrato seria completado mais rapidamente e o fornecimento de substratos ao metabolismo oxidativo seria acelerado, o que tornaria o metabolismo aeróbio mais eficiente (Kiyici *et al.*, 2017). O estudo conduzido em 2017 por Kiyici e colaboradores, demonstrou que o uso crônico de L-Citrulina Malato, na proporção 2:1, foi capaz de reduzir os níveis de lactato sanguíneo após a contração muscular de alta intensidade (Kiyici *et al.*, 2017). Estudos mais recentes, com foco sobre o desempenho físico, não encontraram efeitos agudos no consumo de doses absolutas de 6g (Cutrufello; Gadomski; Zavorsky, 2015), 8g (Gills *et al.*, 2021) ou 12g de L-Citrulina Malato 2:1 (Cunniffe *et al.*, 2016) sobre o desempenho do metabolismo aeróbio ou anaeróbio, em exercício.

Se analisados, de 2017 até o momento atual, 80% das publicações produzidas usando L-Citrulina Malato tiveram como foco o desempenho ou o aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício e em nenhuma delas o metabolismo oxidativo foi observado, embora essa fosse a justificativa principal inicial para o seu uso como suplemento alimentar/esportivo.

Não está claro se efeitos agudos em associação com o exercício não foram observados devido aos mecanismos de ação determinantes serem outros, que não a vasodilatação, e necessitem de ingestão crônica para mover a maquinaria metabólica e consolidar uma ação coordenada: sinalização - atividade enzimática – sinalização – aumento da transcrição/tradução. As conexões entre o funcionamento microvascular, metabolismo e a sinalização do NO como um bioativo frente à suplementação de seus precursores poderiam explicar as divergências nos resultados relatados na literatura e traçar um panorama geral sobre o seu uso nutracêutico, com alvo na melhoria da angiogênese e da ação microvascular do músculo esquelético.

A **figura 4** ilustra os mecanismos de ação através dos quais substâncias e suplementos dietéticos fornecem NO pelas vias canônica e não dependentes das sintases.

**Figura 4. Mecanismos de ação através dos quais substâncias e suplementos dietéticos fornecem NO - Via canônica (via da NO sintases) e Via alternativa (não dependentes das NO sintases)**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** NO: Óxido nítrico;  $\text{NO}_2^-$ : Nitrito;  $\text{NO}_3^-$ : Nitrato; NOS1/nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal; NOS2/iNOS: Óxido nítrico sintase induzível; NOS3/eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial; Cav: Caovelina-1; BH4: Tretabiopterina; FMN: Mononucleotídeo de flavina; FAD: Dinucleotídeo de flavina e adenina; NADPH: Dinucleotídeo de adenina fosfato reduzido; TGI: Trato gastrointestinal;



## 2.5 Malato: interação óxido nítrico, metabolismo energético e angiogênese no músculo esquelético

A literatura científica tem demonstrado uma relação cada vez mais estreita entre o óxido nítrico, o controle vascular, o metabolismo e a angiogênese, que parecem orquestrar uma série de respostas transcricionais em genes angiogênicos (Eelen *et al.*, 2018). Em células endoteliais, o metabolismo energético é fator decisivo para um adequado brotamento de vasos (Vandekeere; Dewerchin; Carmeliet, 2015), e falhas na capacidade metabólica estão relacionadas com o envelhecimento dessas células (Le, 2023; Lin *et al.*, 2022). Apesar da redução do oxigênio tecidual ser um ponto de partida para alavancar o processo de brotamento de novos vasos, o silenciamento da cadeia respiratória não é capaz de impedir a angiogênese (De Bock *et al.*, 2013). O estudo conduzido por De Bock, Georgiadou Schoors, Kuchnio e colaboradores evidenciou a glicólise como fonte predominante de energia em células endoteliais. No entanto, novos trabalhos demonstraram que a oxidação de ácidos graxos é determinante para o brotamento adequado de novos vasos, a partir de uma sinalização coordenada pela atividade da Carnitina Palmitoil Transferase 1 (Schoors *et al.*, 2015). Dessa forma, enquanto a glicólise promove a ramificação do vaso, a oxidação de ácidos graxos regula seletivamente a proliferação de células no pedúnculo endotelial que originará o brotamento (Lin *et al.*, 2022). Contudo, o metabolismo endotelial parece ser tecido específico (Reiterer; Branco, 2020), e pouco se sabe sobre o comportamento metabólico das células endoteliais residentes no músculo esquelético.

A resposta angiogênica no músculo esquelético e a ativação dos fatores de transcrição como HIF-1 $\alpha$  e VEG é bem relatada (Eelen *et al.*, 2018; Schoors *et al.*, 2015) e ambos respondem à disponibilidade de oxigênio no tecido e ao estresse mecânico muscular. Para além do que os une, enquanto o HIF-1 $\alpha$  responde ao estresse mecânico por estiramento da fibra muscular (Milkiewicz *et al.*, 2007), o VEGF responde ao estresse de cisalhamento (Uchida *et al.*, 2015). O exercício físico em domínio severo demonstra capacidade para reduzir os níveis da saturação arterial de oxigênio (Garvey *et al.*, 2012) e o treinamento em condições hipóxicas promovem ativação do VEGF (Uchida, ambos melhoram a microcirculação muscular via ação de uma família de proteínas sirtuínas com capacidade para regular o HIF-1 $\alpha$  (Ma *et al.*, 2022).

O HIF-1 $\alpha$  é um fator de transcrição multifacetado no tecido muscular, envolvido na angiogênese, na regeneração adequada do tecido (Mason *et al.*, 2004) e na

adaptação à hipóxia, com papel regulatório sobre o VEGF (Xie *et al.*, 2014) e cujos níveis de expressão é maior em fibras com predominância oxidativa (Tipo I) (Mounier; Pedersen; Plomgaard, 2010). O NO parece atuar também como um sensor de quedas na saturação do oxigênio tecidual (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2010; Jackson, 2016) e está envolvido na estabilização e expressão do HIF-1 em diferentes linhagens celulares, em condições hipóxicas (Ball *et al.*, 2012; Kasuno *et al.*, 2004; Kurokawa *et al.*, 2019), além de prejudicar sua degradação em condições normóxicas (Metzen *et al.*, 2003), mas as interações específicas no músculo esquelético ainda não foram reportadas. Apesar de ainda não esclarecidas, o NO está intrincado na rede de adaptações angiogênicas intermediadas pelo HIF-1 $\alpha$  e VEGF (Nguyen *et al.*, 2021) e também figura como modulador potencial na regulação do metabolismo glicolítico e oxidativo no interior celular (Pappas; Wilkinson; Gow, 2023).

A associação de fatores que modulam a disponibilidade de NO e de intermediários diretos do fluxo metabólico celular ainda não foram estudados com foco na sinalização molecular angiogênica. Os resultados de nosso estudo podem contribuir para a ratificar o potencial da suplementação com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato, ou, ainda, refutar seu uso agudo como nutracêutico ou ergogênico. O panorama produzido por nosso estudo pode também despertar o interesse da indústria nutracêutica, e colaborar para o possível desenvolvimento de produtos contendo L-Citrulina derivada da melancia, fruta que contribui fortemente para a economia da região Nordeste e do Brasil, enriquecidos com o Malato, para melhoria do metabolismo e da microvasculatura muscular.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Esta pesquisa tem por finalidade avaliar os efeitos da suplementação oral aguda com L-Citrulina Malato sobre o metabolismo do óxido nítrico e a expressão de genes relacionadas às vias de angiogênese no músculo esquelético com predominância de fibras Tipo II e Tipo I de ratos adultos.

Para alcançar esse objetivo geral, foram definidos objetivos específicos que detalham as variáveis e processos investigados. Esses objetivos buscam analisar diferentes aspectos do metabolismo do óxido nítrico e da expressão de RNA mensageiro (RNAm) nos músculos esqueléticos, considerando as particularidades de cada tipo de fibra muscular."

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Quantificar os efeitos da suplementação aguda de L-Citrulina e L-Citrulina Malato sobre o nitrito e o nitrato plasmáticos;
- Avaliar as concentrações musculares de nitrito, nitrato e de espécies reativas de nitrogênio;
- Investigar a expressão dos genes das NOS que codificam a NOS1 e a NOS3 nos músculos EDL e sóleo;
- Analisar a expressão dos genes da sinalização angiogênica HIF1- $\alpha$  e VEGF nos músculos EDL e sóleo;
- Identificar possíveis respostas diferenciais de músculos com predominância de fibras Tipo I (sóleo) e Tipo II (EDL) frente à suplementação.

## 4 HIPÓTESES

Este estudo propõe que:

1. A suplementação oral aguda com L-Citrulina Malato potencializa o aumento do metabolismo do óxido nítrico provocado pela L-Citrulina isolada e ativa vias de angiogênese no músculo esquelético de ratos adultos.
2. A sinalização angiogênica em músculos com composição predominante de fibras Tipo I é mais responsiva à suplementação por L-Citrulina Malato do que em músculos com mais fibras tipo II.

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo experimental com intervenção em roedores, randomizado, contrabalanceado e controlado, com abordagem quantitativa.

### 5.2 Questões éticas

O estudo foi realizado segundo as normas da “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido e aprovado na Comissão de Ética para Uso Animal da Universidade Federal de Pernambuco – CEUA/UFPE (Anexo 1), sob o título “Avaliação de Dois Protocolos de Suplementação Oral de L-Citrulina Malato 2:1 Sobre a Tolerância ao Exercício, Reatividade Vascular e Expressão de Genes Relacionados à Vasodilatação, Angiogênese e ao Metabolismo Oxidativo Mitocondrial no Músculo Esquelético de Ratos Treinados”, sob o nº0022/2021.

Foram utilizados 48 ratos da linhagem *rattus norvegicus*, cepa Wistar, sexo masculino, adultos, com aproximadamente 210 dias de vida ( $\pm 2$  dias) e 390 g de peso ( $\pm 29$  g). Os animais foram provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Aos 21 dias de vida, os animais foram desmamados, separados das genitoras, realocados e mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE, em condições ambientais controladas (ciclo claro-escuro invertido de 12 horas (20 – 8 horas), em gaiolas coletivas com 3-4 animais do mesmo sexo por caixa, com livre acesso à água e alimentação com dieta padrão para roedores Nuvilab-CR1®).

Foram excluídos os animais que apresentaram sintomas patológicos (pré ou pós experimentação), lesões ou sinais de estresse excessivo durante os procedimentos.

### 5.3 Local do estudo

Os animais foram mantidos no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE.

O protocolo de suplementação, indução de morte, coleta e armazenamento de tecidos foi realizado no Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – CAV/UFPE.

Os protocolos de quantificação de metabólitos do óxido nítrico foram realizados no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP/Ribeirão Preto.

Os protocolos de análise da expressão de RNA mensageiro foram realizados no Laboratório de Distúrbios do Metabolismo – LABDIME - FCA/UNICAMP.

### 5.4 Desenho experimental

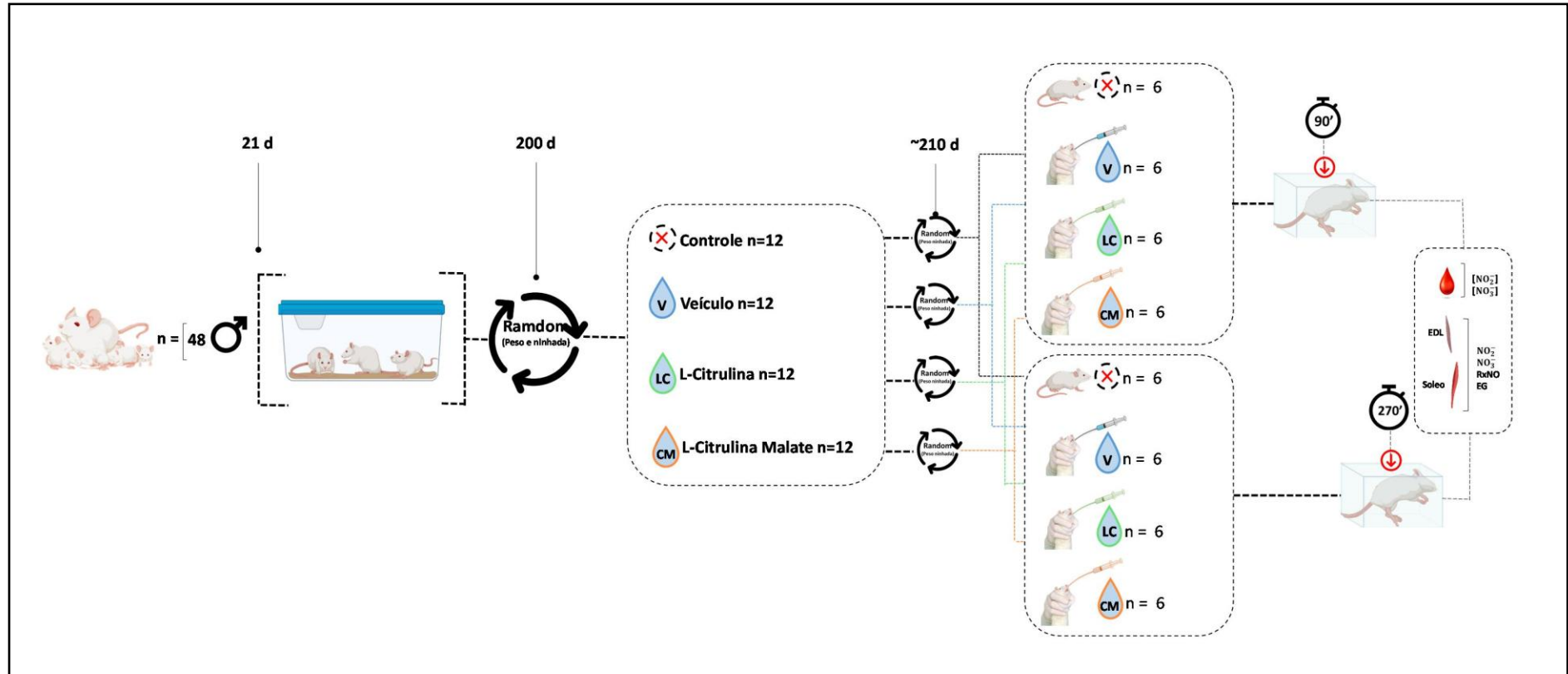
O estudo foi composto por 3 etapas: Etapa 1) Procedimentos pré-experimentais, composta pelo nivelamento de condições ambientais, identificação, pesagem e formação dos grupos experimentais; Etapa 2) Procedimentos experimentais *in vivo*, composta pela aclimação, suplementação oral aguda e indução de morte; Etapa 3) Procedimentos experimentais *post mortem*, composta pela coleta e processamento dos tecidos, quantificação dos metabólitos do óxido nítrico e avaliação da expressão dos genes de interesse.

Ao atingir a idade experimental, os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente com balanceamento, considerando o peso corporal e a ninhada de origem, em 4 grupos:

1. Grupo de animais Controle com n = 12 animais que seriam submetidos apenas ao mesmo ambiente e tempo de aclimação dos demais grupos.
2. Grupo de animais que receberiam água destilada como Veículo, com n = 12 animais.
3. Grupo de animais que receberiam água destilada e L-Citrulina, com n = 12 animais.
4. Grupo de animais que receberiam água destilada e L-Citrulina Malato 2:1, com n = 12 animais.

Para o rastreo das alterações metabólicas e moleculares avaliadas, foram arbitrados 2 momentos para indução da morte dos animais: 90 min após a suplementação (para abordar o momento de pico de concentração plasmática das substâncias após a ingestão) e 270 min após a suplementação (tempo necessário para ativação da expressão de genes metabólicos em resposta à suplementação). Dessa forma, uma nova randomização balanceada dentro de cada bloco foi realizada para gerar os subgrupos experimentais em função do momento de indução de morte após a suplementação. A **figura 5** representa um esquema ilustrativo contendo a visão geral de desenho experimental utilizado.

Figura 5. Visão geral do desenho experimental do estudo.



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Avaliação dos efeitos da suplementação oral aguda com L-Citrulina e L-Citrulina Malato sobre o metabolismo do óxido nítrico e a expressão de genes relacionados ao metabolismo do óxido nítrico e à angiogênese. n = número de animais. d = dias de vida. (♂) Machos. Controle: sem suplementação. Random: alocação aleatória balanceada. Veículo: ingestão de água ultrapura. L-Citrulina: ingestão de 170mg/kg de peso de L-Citrulina diluídos em de água ultrapura. L-Citrulina Malato: ingestão de 260mg/kg de peso de L-Citrulina Malato (2:1), diluídos em de água ultrapura. Metade dos animais de cada grupo teve a morte induzida 90 minutos (90') após a suplementação, e outra metade, 270 minutos após (350'). (⬇️) Indução da morte. (🩸) sangue. EDL: músculo extensor longo dos dedos. [ ] Concentrações plasmáticas; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrito; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrato; RxNO: Espécies nitrosiladas; EG: Expressão de genes. Os tecidos foram coletados para posterior quantificação de metabólitos plasmáticos e musculares e expressão de genes no tecido muscular.



## 5.4 Procedimentos pré-experimentais

### 5.4.1 Nivelamento das condições ambientais

Aos 21 dias de vida, todos os animais foram alocados nos grupos experimentais e mantidos, até aproximadamente 210 dias de vida, no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE, como descrito no tópico 5.2 (Questões éticas).

### 5.4.2 Identificação, pesagem e randomização dos animais

Aos 200 dias de vida, os animais foram identificados individualmente com o uso de violeta genciana (solução spray a 1%). Cada animal recebeu uma marcação em local específico e diferenciado dos demais da mesma caixa. Após a identificação, os animais foram codificados, pesados em uma balança digital, com escala de 1g a 5kg (BlackandDecker-Bc500, Xangai, China), e os valores individuais registrados.

O peso dos animais foi submetido a análise de *outliers* pelo método de ROUT para  $Q=1\%$ . Quando identificados, os *outliers* foram removidos da amostra. Em seguida, os animais foram alocados nos grupos por sorteio aleatório realizado no aplicativo Random.org. Após a formação dos grupos, foi realizada análise estatística para a normalidade dos dados e para identificar diferenças de base nos grupos, relacionadas ao peso corporal dos animais e ao número de animais com mesma ninhada de origem. No terceiro dia que antecedeu as coletas, um novo sorteio aleatório foi realizado dentro de cada grupo para definir os animais que teriam a morte induzida aos 90 min ou aos 270 min após a suplementação. Mais uma vez, a normalidade e a existência de diferenças de base foram testadas e nenhuma diferença foi observada.

## 5.5 Procedimentos experimentais *in vivo*

### 5.5.1 Aclimação

Para promover uma aclimação adequada e reduzir interferências da modificação do ambiente nos dados, os animais foram submetidos ao ambiente

experimental, com condições ambientais e circadianas semelhantes ao ambiente de manutenção (Biotério) por 350min por dia, nos 3 dias que antecederam as coletas.

### 5.5.2 Suplementação

A suplementação foi baseada na dose relativa comumente utilizada para suplementação de L-Citrulina em humanos (abaixo da dose máxima de segurança (Elango, 2023) e na dose máxima com resultados em humanos reportados cientificamente (Moinard *et al.*, 2008). A dose de L-Citrulina Malato foi arbitrada na dose máxima tolerada (Cunniffe *et al.*, 2016), mas com quantidade de L-Citrulina idêntica ao protocolo com L-Citrulina isolada, para que a diferença na ingestão desse aminoácido não fosse um fator de confusão nos resultados. A suplementação foi realizada via gavagem, seguindo as orientações de Brasil (2023), de modo que foram administradas:

1. Para o grupo Veículo, apenas água ultrapura;
2. Para o grupo L-Citrulina, uma dose contendo 170mg de L-Citrulina por kg de peso do animal, diluídos em água ultrapura;
3. Para o grupo L-Citrulina Malato, uma dose contendo 260mg de L-Citrulina Malato 2:1 (173,3 mg de L-Citrulina:86,7 mg de Malato) por kg de peso do animal.

Ambos suplementos foram adquiridos da Active Pharmaceutica - Importadora e Distribuidora de Produtos Farmacêuticos, cujas certificações de pureza encontram-se nos anexos 1 e 2.

### 5.5.4 Indução de morte

Os animais foram anestesiados por dose única de Isoflurano (Virbac Do Brasil Indústria e Comércio Ltda), infundida em caixa de contenção hermética, conforme orientações do COBEA (Brasil, 2023) . Após identificada a perda de reflexos, os animais foram *exsanguinados* e dissecados.

## **5.6 Procedimentos experimentais *post mortem***

### **5.6.1 Coleta e preparação dos tecidos**

#### **5.6.1.1 Plasma**

Durante a *exsanguinação*, foram coletados 4 mL de sangue em tubo EDTA K3, para quantificação de nitrito e nitrato. O conteúdo do tubo foi centrifugado a 4.000 rotações por minuto, a 4 °C, por 10 minutos. O plasma foi extraído, armazenado em *criotubo*, imerso em nitrogênio líquido e, após congelado, transferido para *ultrafreezer*, onde foi mantido a -80 °C para análises posteriores.

#### **5.6.1.2 Músculo esquelético – Extensor longo dos dedos (EDL) e Sóleo.**

Após a *exsanguinação*, as patas traseiras foram dissecadas e os músculos EDL e sóleo removidos, pesados, porcionados para cada análise a ser realizada, armazenados em *criotubo*, imersos em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos para *ultrafreezer*, onde foram mantidos a -80 °C para análises de metabólitos do NO e análises moleculares.

### **5.6.2 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico (NO)**

O plasma foi utilizado em sua totalidade após o descongelamento à temperatura ambiente. As amostras musculares foram previamente descongeladas à temperatura ambiente, maceradas em macerador de vidro contendo PBS pH 7,4 (Feelisch *et al.*, 2002), centrifugadas (4 min a 3000×g) e, em seguida, o sobrenadante foi coletado para as análises de concentração. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

#### **5.6.2.1 Quantificação das concentrações de nitrito**

Para determinar as concentrações de nitrito, alíquotas plasmáticas ou sobrenadantes musculares foram analisadas usando ensaios de quimioluminescência redutora à base de ozônio, como descrito anteriormente (Amaral *et al.*, 2015; Feelisch *et al.*, 2002). Plasma ou 250 µl de sobrenadante muscular com N-etilmaleimida (10 mM) e DTPA (2 mM) foram injetados em uma solução acidificada de triiodeto, que foi injetada em *purge vessel* contendo nitrogênio, acoplado a um analisador de NO por quimioluminescência em fase gasosa (NO Analyzer, modelo 280, Sievers®; Boulder, CO, EUA). As concentrações de nitrito no tecido muscular foram normalizadas para o peso do tecido macerado. A aquisição de dados, bem como as análises, foi realizada utilizando o software gráfico eDAQ®.

#### 5.6.2.2 Quantificação das concentrações de nitrato

Para determinar as concentrações de nitrato, alíquotas plasmáticas ou sobrenadantes musculares foram analisadas por ensaio de quimioluminescência redutora à base de ozônio, conforme descrito anteriormente (Amaral *et al.*, 2015; Feelisch *et al.*, 2002). Os nitratos foram medidos injetando-se 20 µl de plasma ou 50 µl de sobrenadante em uma solução de vanádio (III) em ácido clorídrico 1 M a 96 °C. Uma corrente de nitrogênio foi borbulhada através do *purge vessel* contendo vanádio (III) e, em seguida, para o analisador de NO (NO Analyzer, modelo 280, Sievers®; Boulder, CO, EUA), que detecta o NO liberado por quimioluminescência. As concentrações de nitrato nos tecidos foram normalizadas para o peso do tecido macerado. A aquisição de dados, bem como as análises, foi realizada utilizando o software gráfico eDAQ®.

#### 5.6.2.3 Quantificação das concentrações de espécies reativas de nitrogênio

Para determinar as concentrações de espécies reativas de nitrogênio, o sobrenadante muscular foi analisado pelo método de quimioluminescência redutora à base de ozônio (40). A amostra foi adicionada a um tubo com solução de sulfanilamida (5% em ácido clorídrico 1M) na proporção de 10% do volume final da solução. Após 3 minutos de reação, 400 µl da amostra foram injetados no *purge vessel* em sistema fechado, contendo solução acidificada de triiodeto 67mM, iodeto de potássio e iodo 30mM em ácido acético glacial (41). Em outro tubo âmbar, a amostra foi adicionada a uma solução de cloreto de mercúrico (2%) por 2 min, seguida da adição de ácido de

sulfanilamida (5% em ácido clorídrico 1M) por 3 min, na proporção de 10% do volume fim da solução. Após o tempo de reação, 400 µl da amostra foram injetados no *purge vessel*, conforme descrito anteriormente. Os espécies reativas de nitrogênio da amostra foram reduzidos a óxido nítrico, que é transportado por gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics® CLD 88sp). O óxido nítrico formado reage com o ozônio, resultando em quimioluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO. A aquisição de dados, bem como as análises, foi realizada utilizando o software gráfico eDAQ®.

#### 5.6.6 Análise da expressão de genes

Após descongelamento, fragmentos dos músculos EDL e Sóleo foram homogeneizados individualmente para extração de RNA total com reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA das amostras foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (A260) e a 280nm (A280), e a integridade do RNA isolado foi determinada pela razão A260:A280, em NanoDrop UV-Vis (2000, ThermoScientific). Em seguida, foi realizada a transcrição reversa foi realizada com 3µg de RNA total, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as instruções do fabricante. A expressão gênica relativa foi determinada na plataforma ABI Prism 7500 Fast, utilizando primers com sistema de detecção SybR para os genes alvo NOS1, NOS3, HIF-1α e VEGF, tendo b-actina como controle endógeno. Para a reação de PCR foram usados 20ng de DNA complementar. Os dados foram expressos como valores relativos, determinados pelo método de comparação do *threshold cycle* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), de acordo com a recomendação do fabricante. (Simino *et al.*, 2022).

#### 5.6.7 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram plotados em estatística descritiva com média  $\pm$  erro padrão da média, para descrever a tendência central e a dispersão dos dados. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e, nos casos em que a distribuição foi considerada não normal o teste de ROUT (para Q = 1%) foi usado para identificação de outliers verdadeiros, que foram removidos da amostra. Uma análise de variância de dois caminhos (Two-way ANOVA) para modelos

mistos foi utilizada para determinar os efeitos do suplemento, do tempo após a ingestão e da interação suplemento-tempo. Em caso de diferenças significativas indicadas, o pós-teste de *Holm Sidak* foi aplicado para identificar a localização da diferença. A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism (*GraphPad Software*®, LLC, versão 9.0.0 (121) para Windows) e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

A respeito do metabolismo do óxido nítrico, serão apresentadas as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e ( $\text{NO}_3^-$ ) no plasma, bem como as concentrações musculares de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e espécies reativas de nitrogênio ( $\text{RxNO}^-$ ), além de expressão dos genes que codificam as sintases do óxido nítrico (NOS1 e NOS3) nos músculos EDL. e sóleo.

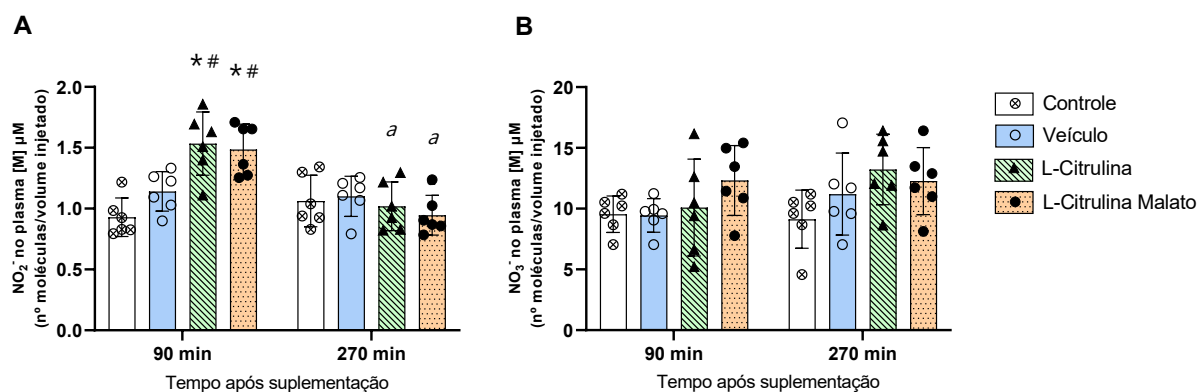
Quanto às respostas angiogênicas, serão apresentados os resultados da modulação da expressão dos genes HIF-1 $\alpha$  e VEGF.

### 6.1 Metabolismo do óxido nítrico

#### 6.1.1 Nitrato e Nitrito plasmáticos

Os efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato estão demonstrados na **figura 6**.

**Figura 6. Efeitos da suplementação oral aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre as concentrações plasmáticas de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) em ratos adultos**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Controle: sem suplementação. Veículo: ingestão de 5mL de água ultrapura. L-Citrulina: ingestão de 170mg/kg de peso de L-Citrulina diluídos em 5mL de água ultrapura. L-Citrulina Malato: ingestão de 260mg/kg de peso de L-Citrulina Malato (2:1), diluídos em 5mL de água ultrapura. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. \* Maior que o grupo Controle no mesmo ponto no tempo. # Maior que o grupo Veículo no mesmo ponto no tempo. <sup>a</sup> Menor que o próprio grupo aos 90 minutos.

Em relação ao nitrito plasmático, houve interação significativa entre tempo e suplementação ( $F_{(3,20)} = 11,100$ ;  $p = 0,001$ , **fig. 6A**). Aos 90 min após a suplementação,

a concentração de nitrito plasmático foi maior nos grupos L-Citrulina ( $1,15 \pm 0,26$  [M]  $\mu\text{M}$ ), e L-Citrulina Malato ( $1,49 \pm 0,21$  [M]  $\mu\text{M}$ ) foi maior do que nos grupos Controle ( $0,93 \pm 0,16$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e Veículo ( $1,14 \pm 0,16$  [M]  $\mu\text{M}$ ). Aos 270 min após a suplementação, não houve diferenças significativas entre os grupos (Controle:  $1,06 \pm 0,21$ ; Veículo:  $1,10 \pm 0,17$ ; L-Citrulina:  $1,02 \pm 0,20$ ; L-Citrulina Malato:  $0,95 \pm 0,16$  [M]  $\mu\text{M}$ ).

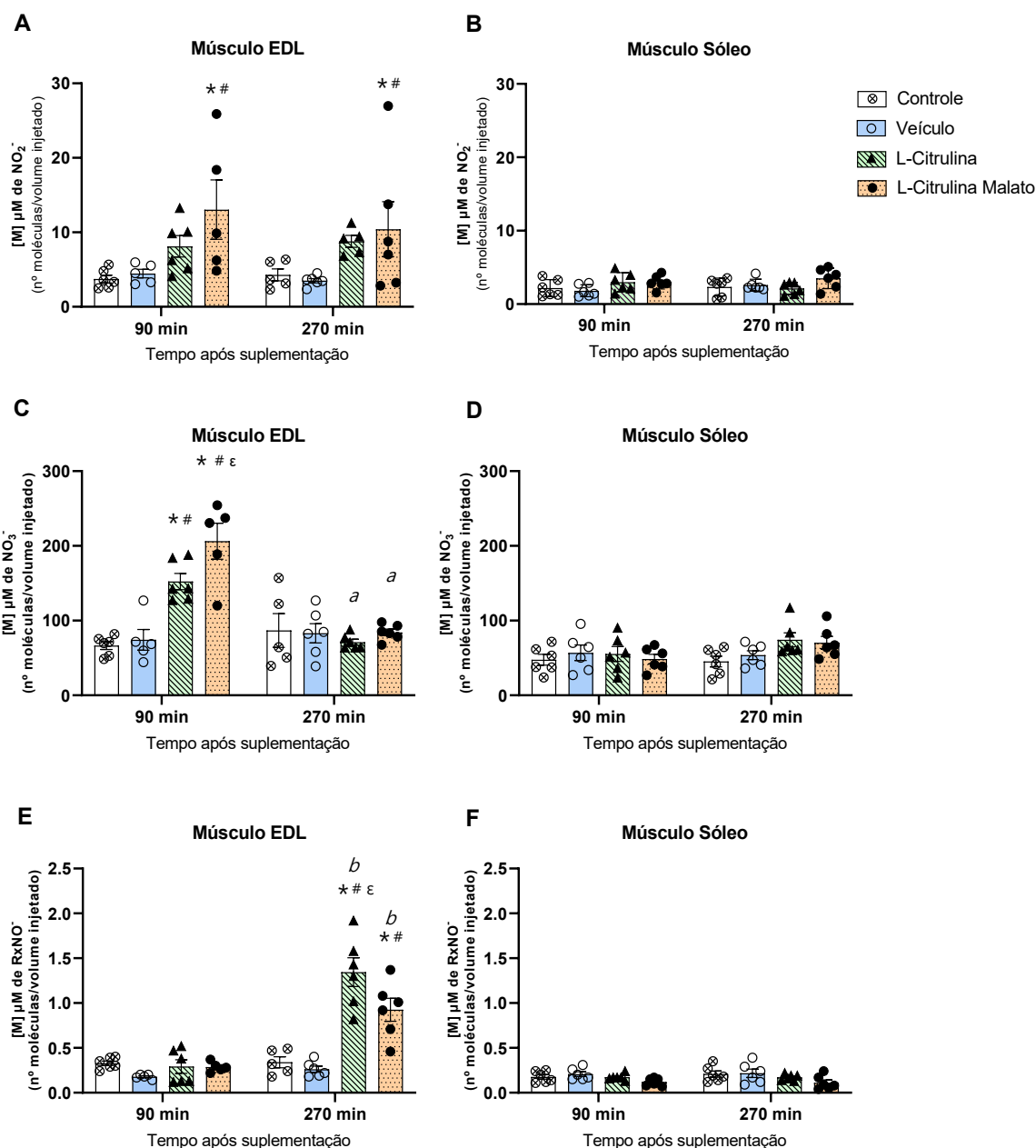
Não houve efeito da suplementação ( $F_{(3,40)} = 2,761$ ;  $p = 0,054$ ), tempo ( $F_{(1,40)} = 1,914$ ;  $p = 0,174$ ), ou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,40)} = 1,061$ ;  $p = 0,376$ ) para nitrato plasmático (**fig. 6B**).

#### *6.1.2 Nitrato, Nitrito e Espécies reativas de nitrogênio no músculo esquelético*

Os efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre os metabólitos do NO estão demonstrados na **figura 7**.



**Figura 7 – Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre as concentrações musculares de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e espécies reativas de nitrogênio de óxido nítrico ( $\text{RxNO}^\bullet$ ) de ratos adultos**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Controle: sem suplementação. Veículo: ingestão de 5mL de água ultrapura. L-Citrulina: ingestão de 170mg/kg de peso de L-Citrulina diluídos em 5mL de água ultrapura. L-Citrulina Malato: ingestão de 260mg/kg de peso de L-Citrulina Malato (2:1), diluídos em 5mL de água ultrapura. As concentrações de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{RxNO}^\bullet$  no músculo EDL (extensor longo dos dedos) estão representadas nas figuras 6A, 6C e 6E respectivamente, enquanto no músculo sóleo, estão representadas em 6B, 6D e 6F, respectivamente. \* Maior que o grupo controle no mesmo ponto no tempo. # Maior que o grupo Veículo no mesmo ponto no tempo. ε Maior que o grupo L-Citrulina no mesmo ponto no tempo. <sup>a</sup> Menor que o próprio grupo aos 90 minutos. <sup>b</sup> Maior que o próprio grupo aos 90 minutos.

Em relação aos níveis de nitrito no músculo EDL (**fig. 7A**), foram observados efeitos da suplementação ( $F_{(3,20)} = 4,482$ ;  $p = 0,015$ ), mas não do tempo ( $F_{(3,20)} = 0,120$ ;  $p = 0,733$ ) ou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,16)} = 8,119$ ;  $p = 0,506$ ). Independentemente do tempo de análise, a concentração de nitrito no músculo EDL foi maior no grupo L-Citrulina Malato ( $13,00 \pm 3,98$  [M]  $\mu\text{M}$ ) do que nos grupos Controle ( $3,73 \pm 0,51$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e Veículo ( $4,47 \pm 0,58$  [M]  $\mu\text{M}$ ), mas não em relação ao grupo L-Citrulina ( $8,49 \pm 1,26$  [M]  $\mu\text{M}$ ).

Em relação aos níveis de nitrito no músculo Sóleo (**fig. 7B**), não foram observados efeitos da suplementação ( $F_{(3,40)} = 2,392$ ;  $p = 0,083$ ), tempo ( $F_{(1,40)} = 0,230$ ;  $p = 0,635$ ) ou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,40)} = 1,307$ ;  $p = 0,286$ ).

Em relação às concentrações de nitrato no músculo EDL (**fig. 7C**), foi identificada uma interação suplementação-tempo ( $F_{(3,17)} = 17,260$ ;  $p < 0,001$ ). Aos 90 min após a suplementação, as concentrações de nitrato no músculo EDL foram maiores nos grupos L-Citrulina ( $1,15 \pm 0,26$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e L-Citrulina Malato ( $1,49 \pm 0,21$  [M]  $\mu\text{M}$ ) do que nos grupos Controle ( $0,93 \pm 0,16$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e Veículo ( $1,14 \pm 0,16$  [M]  $\mu\text{M}$ ). Aos 270 min após a suplementação, não houve diferenças significativas entre os grupos.

Em relação aos níveis de nitrato no músculo sóleo (**fig. 7D**), não foram observados efeitos da suplementação ( $F_{(3,40)} = 1,783$ ;  $p = 0,166$ ), tempo ( $F_{(1,40)} = 2,302$ ;  $p = 0,137$ ) ou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,40)} = 1,331$ ;  $p = 0,278$ ).

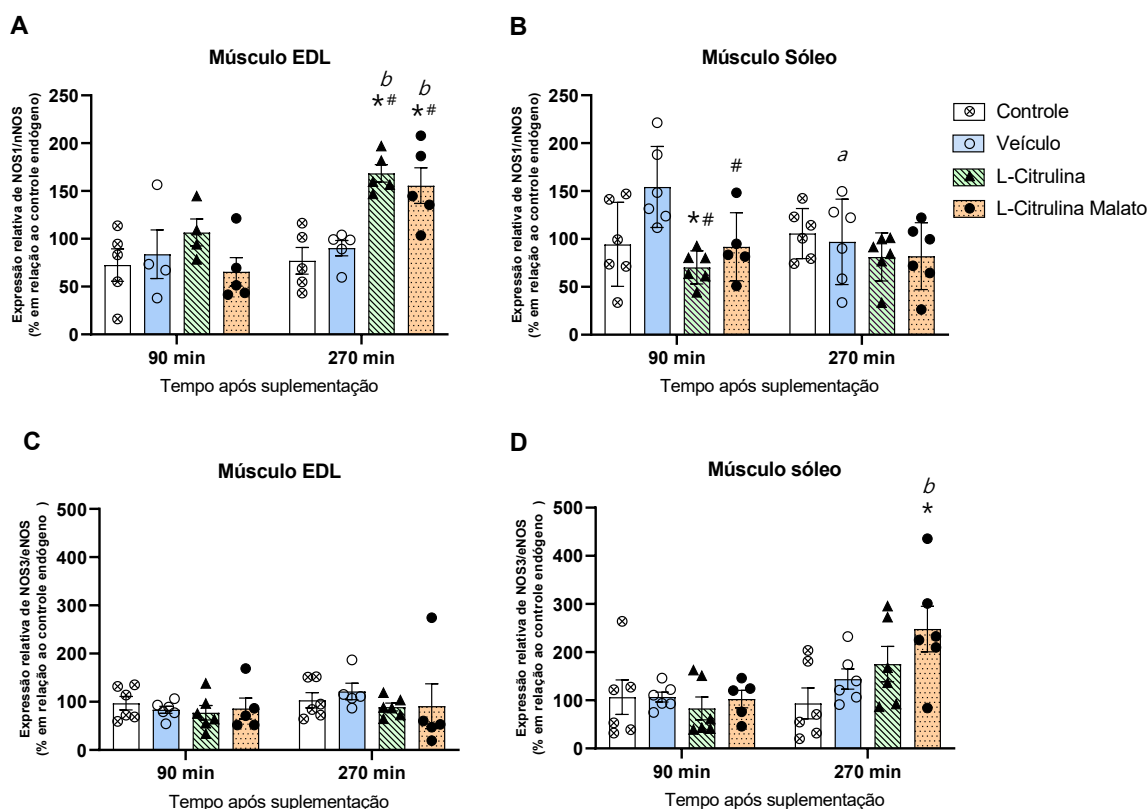
Em relação às concentrações de espécies reativas de nitrogênio no músculo EDL (**fig. 7E**), houve interação suplementação-tempo ( $F_{(3,17)} = 20,440$ ;  $p < 0,001$ ). Aos 90 min após a suplementação, não houve diferenças entre os grupos. Aos 270 min após a ingestão, os grupos L-Citrulina ( $1,350 \pm 0,161$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e L-Citrulina Malato ( $0,925 \pm 0,128$  [M]  $\mu\text{M}$ ) demonstraram níveis mais altos de espécies reativas de nitrogênio na comparação com os grupos Controle ( $0,340 \pm 0,061$  [M]  $\mu\text{M}$ ) e Veículo ( $0,262 \pm 0,034$  [M]  $\mu\text{M}$ ).

Em relação às concentrações de espécies reativas de nitrogênio no músculo sóleo (**fig. 7F**), houve efeito apenas da suplementação ( $F_{(3,20)} = 3,608$ ;  $p = 0,031$ ). O grupo L-Citrulina Malato ( $0,012 \pm 0,032$  [M]  $\mu\text{M}$ ) demonstrou níveis mais baixos que o grupo Veículo ( $0,217 \pm 0,046$  [M]  $\mu\text{M}$ ), sem diferenças em relação ao Controle ( $0,208 \pm 0,046$  [M]  $\mu\text{M}$ ) ou L-Citrulina ( $0,172 \pm 0,014$  [M]  $\mu\text{M}$ ). Não houve efeito do tempo ( $F_{(1,20)} = 0,191$ ;  $p = 0,667$ ) e interação suplementação-tempo ( $F_{(3,20)} = 0,235$ ;  $p = 0,871$ ).

### 6.1.3 Expressão de genes das sintases de Óxido Nítrico no músculo esquelético

Os efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre a expressão dos genes que codificam as enzimas sintetizadoras de óxido nítrico neuronal (NOS1) e endotelial (NOS3) estão demonstrados na **figura 8** (fig. 8).

**Figura 8 – Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre a expressão dos genes que codificam as óxido nítrico sintases neuronal (NOS1) e endotelial (NOS3) no músculo de ratos adultos**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Controle: sem suplementação. Veículo: ingestão de 5mL de água ultrapura. L-Citrulina: ingestão de 170mg/kg de peso de L-Citrulina diluídos em 5mL de água ultrapura. L-Citrulina Malato: ingestão de 260mg/kg de peso de L-Citrulina Malato (2:1), diluídos em 5mL de água ultrapura. A expressão de NOS1 e NOS3 no músculo EDL (extensor longo dos dedos) estão representadas nas figuras 7A e 7C respectivamente, enquanto no músculo sóleo, estão representadas em 7B e 7D, respectivamente. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

\* Maior que o grupo controle no mesmo ponto no tempo. # Maior que o grupo Veículo no mesmo ponto no tempo. <sup>b</sup> Maior que o próprio grupo aos 90 minutos. <sup>a</sup> Menor que o próprio grupo aos 90 minutos.

A expressão de NOS1 no músculo EDL (**fig. 8A**) apresentou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,12)} = 10,740$ ;  $p = 0,001$ ). Aos 90 min após a ingestão, não foram observadas diferenças entre os grupos. Aos 270 min, a expressão de NOS1 foi aumentada em L-Citrulina ( $168,0 \pm 9,1$  %) e L-Citrulina Malato ( $156,0 \pm 18,6$  %) quando comparados com Controle ( $77,0 \pm 13,9$  %) e Veículo ( $90,2 \pm 8,0$ ).

A expressão de NOS1 no músculo sóleo (**fig. 8B**) também apresentou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,19)} = 4,295$ ;  $p = 0,018$ ). Aos 90 min após a suplementação, a expressão de NOS1 no músculo sóleo foi maior no grupo Veículo ( $154,0 \pm 17,3$  %) do que nos grupos Controle ( $94,4 \pm 17,9$  %), L-Citrulina ( $70,4 \pm 7,1$  %) e L-Citrulina Malato ( $91,8 \pm 15,9$  %).

A expressão de NOS3 no músculo EDL (**fig. 8C**) não apresentou efeito da suplementação ( $F_{(3,19)} = 0,318$ ;  $p = 0,812$ ), tempo ( $F_{(1,18)} = 2,035$ ;  $p = 0,171$ ) ou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,19)} = 0,514$ ;  $p = 0,678$ ).

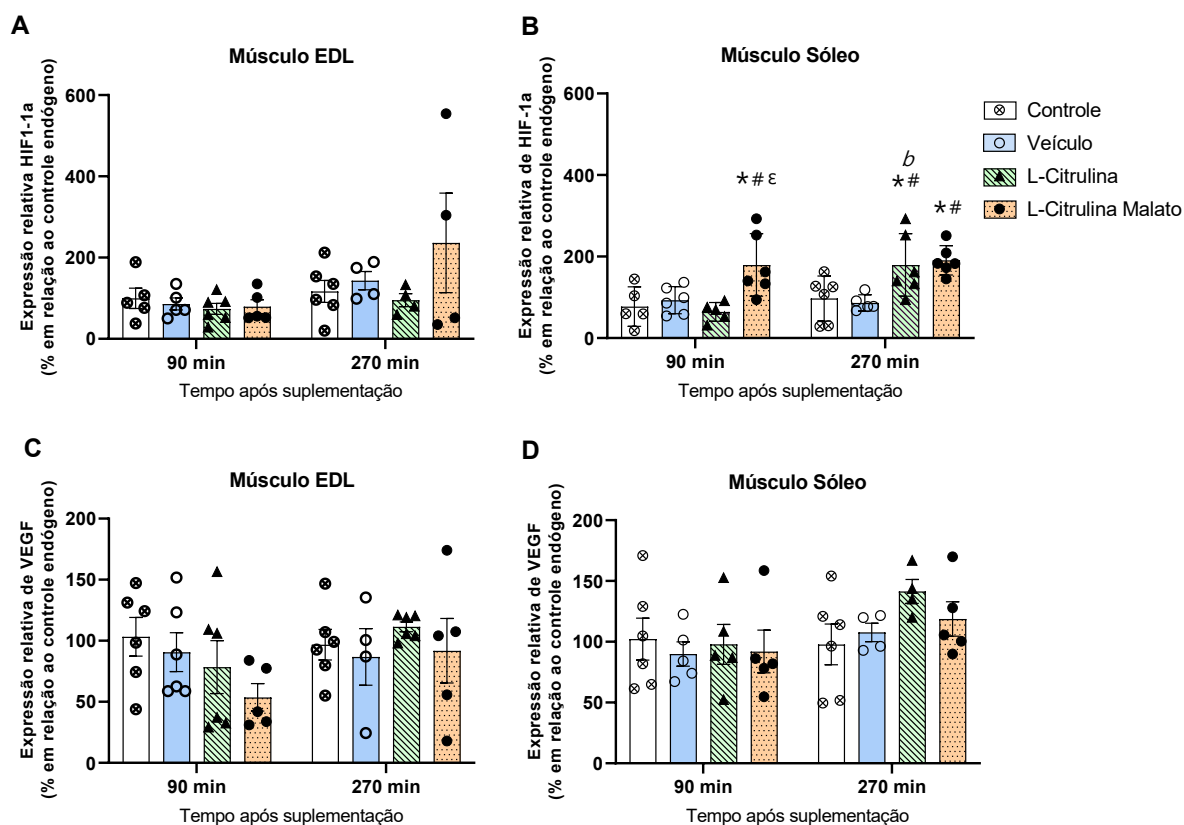
A expressão de NOS3 no músculo sóleo (**fig. 8D**) apresentou efeito apenas do tempo ( $F_{(1,19)} = 11,160$ ;  $p = 0,003$ ), com valores sendo maiores em 270 min do que em 90 minutos.

## 6.2 Sinalização angiogênica

### 6.2.1 Expressão de RNAm angiogênicos no músculo esquelético

Os efeitos da suplementação L-Citrulina ou de L-Citrulina Malato sobre a sinalização angiogênica estão representados na **figura 9**.

**Figura 9 – Efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina ou L-Citrulina Malato sobre a expressão dos genes que codificam o Fator Induzido por Hipóxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) no músculo de ratos adultos**



**FONTE. Elaborada pela autora (2024).** Controle: sem suplementação. Veículo: ingestão de 5mL de água ultrapura. L-Citrulina: ingestão de 170mg/kg de peso de L-Citrulina diluídos em 5mL de água ultrapura. L-Citrulina Malato: ingestão de 260mg/kg de peso de L-Citrulina Malato (2:1), diluídos em 5mL de água ultrapura. A expressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF no músculo EDL (extensor longo dos dedos) estão representadas nas figuras 8A e 8C respectivamente, enquanto no músculo sóleo, estão representadas em 8B e 8D, respectivamente. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. \* Maior que o grupo controle no mesmo ponto no tempo. # Maior que o grupo Veículo no mesmo ponto no tempo.  $^{\epsilon}$  Maior que o grupo L-Citrulina no mesmo ponto no tempo.  $^b$  Maior que o próprio grupo aos 90 minutos.

A expressão do gene que codifica o HIF-1 $\alpha$  no músculo EDL (**fig. 9A**) não apresentou efeito da suplementação ( $F_{(3,20)} = 1,006$ ;  $p = 0,0724$ ), tempo ( $F_{(1,11)} = 3,948$ ;  $p = 0,4106$ ) ou interação ( $F_{(3,11)} = 0,9743$ ;  $p = 0,4397$ ).

A expressão do gene que codifica o HIF-1 $\alpha$  no músculo sóleo (**fig. 9B**), apresentou interação suplementação-tempo ( $F_{(3,37)}=3,040$ ;  $p=0,041$ ). Aos 90 min após a ingestão, a expressão de HIF-1 $\alpha$  no grupo L-Citrulina Malato ( $111,2 \pm 12,4$  %) foi maior em comparação com os grupos Controle ( $77,2 \pm 21,6$  %), Veículo ( $93,0 \pm 13,7$  %) e L-Citrulina ( $64,3 \pm 10,3$  %). Aos 270 min, a expressão foi aumentada em L-Citrulina

( $179,0 \pm 31,3$  %) e L-Citrulina Malato ( $191,3 \pm 14,7$  %) quando comparados aos grupos Controle ( $97,1 \pm 22,6$  %) e Veículo ( $86,5 \pm 9,0$  %).

A expressão do gene que codifica o VEGF no músculo EDL (**fig. 9C**) não apresentou efeito da suplementação ( $F_{(3,19)} = 0,821$ ;  $p = 0,498$ ), tempo ( $F_{(1,17)} = 1,891$ ;  $p = 0,187$ ) ou interação ( $F_{(3,17)} = 1,080$ ;  $p = 0,384$ ).

A expressão do gene que codifica o VEGF no músculo sóleo (**fig. 9D**) não apresentou efeito da suplementação ( $F_{(3,32)} = 0,737$ ;  $p = 0,538$ ), tempo ( $F_{(1,32)} = 3,739$ ;  $p = 0,062$ ) ou interação ( $F_{(3,32)} = 0,908$ ;  $p = 0,448$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Aqui, avaliamos o metabolismo do óxido nítrico plasmático e muscular, a expressão dos genes que codificam as NOS e de genes angiogênicos em músculos esqueléticos de ratos adultos, com diferentes composições predominantes de fibras musculares (EDL e sóleo) em resposta à suplementação oral aguda de L-Citrulina e L-Citrulina Malato. Nossos resultados demonstraram que os metabólitos diretos do NO (nitrito, nitrato e espécies reativas de nitrogênio) e que a expressão dos genes das NOS são aumentados pela suplementação de L-Citrulina e L-Citrulina Malato, mas apenas no músculo EDL, não no sóleo. Demonstramos também que a L-Citrulina Malato é mais eficiente na ativação do metabolismo do NO do que a L-Citrulina isolada. Em relação à ativação da expressão de genes angiogênicos, apenas o músculo sóleo foi responsivo à suplementação, com aumento da expressão de HIF-1 $\alpha$ . A L-Citrulina Malato é capaz de ativar o HIF-1 $\alpha$  mais precocemente que a L-Citrulina isoladamente. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avaliou, no músculo esqueléticos, metabólitos do NO e expressão de genes das NOS e angiogênicos, em resposta à ingestão oral de L-Citrulina ou L-Citrulina Malato.

O aumento dos metabólitos do NO no plasma sanguíneo após a ingestão de L-Citrulina, observado em nossos resultados, é corroborado por estudos em animais (Berthe *et al.*, 2011) e também em humanos (Schwedhelm *et al.*, 2008). A L-Citrulina ingerida por via oral é convertida em L-Arginina nos rins, promovendo o aumento desse aminoácido no plasma entre 60 e 90 minutos após a ingestão. O consequente aumento da L-Arginina no plasma é acompanhado pela elevação da produção de NO (Kim *et al.*, 2015), que é rapidamente oxidado a nitrito e em seguida a nitrato. Hou e colaboradores demonstraram que a ingestão de Malato, isolado, por animais espontaneamente hipertensos e com baixos níveis endógenos de L-Arginina e NO também foi capaz de aumentar os níveis de NO (Hou *et al.*, 2017). O referido estudo propôs que o mecanismo responsável pelo aumento do NO estava relacionado à conversão Malato – Oxaloacetato – Aspartato - L-Citrulina - L-Arginina - NO. Entretanto, a adição de Malato à L-Citrulina não potencializou o aumento observado com L-Citrulina isolada, em nosso estudo. É possível que a adição de L-Citrulina tenha fornecido L-Arginina suficiente para atingir a saturação ou velocidade enzimática máxima. Estudos com investigação dose-resposta aguda com L-Citrulina e L-Citrulina Malato ainda não foram conduzidos.

Em nosso estudo, apenas o nitrito foi aumentado, aos 90 minutos após a ingestão. A metabolização do NO no sangue ocorre de forma rápida, tendo o nitrito como produto direto da oxidação do NO no plasma, seguido de oxidação a nitrato, como uma forma mais estável (Lundberg; Weitzberg; Gladwin, 2008). Aos 270 minutos, os valores de nitrito foram normalizados, o que está de acordo com a meia-vida demonstrada para o nitrito plasmático a partir de outros precursores (Ferreira *et al.*, 2021; Pinheiro *et al.*, 2018) e da L-Citrulina (Bahadoran *et al.*, 2021). Aqui, demonstramos que o nitrato plasmático não apresentou diferenças significativas, como esperado. Contudo, os valores demonstraram tendência para efeito relativo ao tratamento ( $p = 0,055$ ) com L-Citrulina Malato; a dispersão dos nossos dados pode ter dificultado o estabelecimento de diferenças significativas. Estudos publicados anteriormente, com a ingestão de L-Citrulina, demonstraram aumento na produção de nitrato (Berthe *et al.*, 2011; Schwedhelm *et al.*, 2008). Contudo, o nitrato foi medido na urina, após a suplementação (não no plasma), e o protocolo utilizou uso diário por pelo menos uma semana. O tempo maior de utilização da suplementação certamente consolidou o aumento do nitrato e sua observação através da urina, o que pode justificar a diferença com nossos resultados.

No músculo esquelético, foi observada elevação do metabolismo do NO, com aumento das concentrações de nitrito, nitrato e espécies reativas de nitrogênio, mas apenas no músculo EDL. A característica morfológica do EDL é a predominância de fibras tipo II (~90%) (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990), enquanto no sóleo, a composição é predominantemente de fibras tipo I (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Wigston; English, 1992). Foi demonstrado anteriormente que o conteúdo de NOS1, no músculo esquelético com mais fibras Tipo II, é muito superior ao de NOS3 (Kobzik *et al.*, 1994; Stamler; Meissner, 2001) e que sua atividade para gerar NO pode ser até 6 vezes maior que a da NOS3, em condições de fornecimento adequado de substrato (Adak; Aulak; Stuehr, 2001).

As fibras de contração do tipo II são recrutadas em condições de elevação rápida da demanda metabólica, com baixas concentrações de oxigênio (Jones *et al.*, 2016) e metabolismo glicolítico predominante (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990), como ocorre em exercícios intensos. Dessa forma, pode-se esperar que músculos com baixa oxigenação possuam uma maquinaria mais eficiente para metabolização do NO a compostos mais estáveis, como o nitrato. Esses compostos podem ser acionados em condições de redução da pressão parcial do



oxigênio no tecido e necessidade de ajustes microvasculares imediatos (Jones *et al.*, 2016). Isso poderia explicar, ao menos em partes, as diferenças que observamos nas concentrações de metabólitos do NO entre o EDL e o sóleo.

Os resultados obtidos demonstraram que a suplementação com L-Citrulina Malato é mais eficiente para aumentar os níveis de nitrito no EDL do que a L-Citrulina isolada. A metabolização da L-Arginina a NO é promovida com o uso de NADPH e FAD pelas NOS (Wu; Morris, 1998), tendo o NADPH como limitante para o primeiro passo da atividade enzimática (Gantner; LaFond; Bonini, 2020). Em células pancreáticas (Munhoz *et al.*, 2016), hepáticas (McHugh; Drake, 1989) e adiposas (McHugh; Drake, 1989), a Malato Desidrogenase é capaz de converter Malato em Piruvato e ativar vias anabólicas (Simmen; Alhallak; Simmen, 2020) sob condições energéticas favoráveis.

Uma isoenzima da Malato Desidrogenase, a Malato Desidrogenase 1, foi identificada no citosol de células musculares (Taroni; Di Donato, 1988). Embora não demonstrado experimentalmente em células musculares do tipo II, é possível supor que, em condições de repouso e insulina em níveis basais, com predominância do metabolismo glicolítico, maquinaria oxidativa pouco desenvolvida e baixo conteúdo mitocondrial, o Malato suplementado tenha sido desviado para a produção de energia glicolítica via produção de piruvato e NADPH. Em contrapartida, os níveis de NADPH gerados poderiam ser utilizados pela NOS1 sarcoplasmática como cofator do domínio redutase, e potencializar a produção de NO (Wu; Morris, 1998). Contudo, são necessários outros estudos direcionadas a confirmar ou refutar esse mecanismo.

O músculo esquelético tem se configurado como um estoque de nitrato, que pode ser acessado, quando necessário, para gerar NO pelas vias não canônicas (Piknova *et al.*, 2016). Logo, esperávamos que os níveis de nitrato se mantivessem elevados no EDL ainda aos 270 min após a ingestão, contudo, esse efeito não foi observado. Estudos com ingestão de nitrato (Park *et al.*, 2021) demonstraram resultados divergentes dos nossos, com concentrações elevadas tanto de nitrito quanto de nitrato, seja em músculos com predominância de fibras do tipo II, seja com predominância do tipo I. Os estudos de Park *et al.* (2021) utilizaram ingestão de água enriquecida por nitrato durante 5 dias. Apesar de ambos, Nitrato e L-Citrulina, promoverem a geração de NO, os mecanismos relacionados são diferentes. A via da L-Citrulina é dependente das NOS, enquanto a do Nitrato, embora envolva também as NOS, depende das nitrato redutases, xantina oxidases, sialinas e mioglobinas, além do

metabolismo das bactérias comensais do trato oral (para revisão, ver (Kapil *et al.*, 2020; Piknova *et al.*, 2022; Van Faassen *et al.*, 2009). As características específicas do precursor de NO, associadas ao tempo utilizado no protocolo de suplementação, podem justificar os resultados diferentes entre os estudos.

A ausência de efeitos significativos no músculo sóleo pode derivar do seu perfil metabólico. Alguns estudos têm relatado que os níveis de nitrato são comumente superiores em músculos com predominância de fibras Tipo I, quando comparados aos predominantemente compostos por Tipo II (Park *et al.*, 2021), contudo, isso não foi observado aqui. Supomos que os níveis de nitrato armazenados no sóleo já estivessem adequados e que a ausência de estresse de cisalhamento ou de alterações nos níveis de cálcio, não estimularam um aumento significativo da sua produção para estocagem. Ainda, músculos com predominância de fibras Tipo I são amplamente vascularizados, além de possuírem pressão parcial do oxigênio e número de eritrócitos normalmente mais altos, cujas reduções são pontos de controle para a produção de NO via NOS3 (Michel, 1998). É de se esperar que as reservas já presentes suprissem as necessidades imediatas de NO, quando necessário, enquanto novos aportes poderiam ser fornecidos via NOS3, ativadas por outros mecanismos, como influxo aumentado de cálcio (Kuchan; Frangos, 1994), níveis de glicose e insulina (Tsukahara *et al.*, 1994) e pelas forças de cisalhamento promovidas pelo aumento do fluxo sanguíneo (Michel, 1998), como ocorre durante o exercício físico.

No EDL, a NOS1 teve a expressão do RNAm regulada positivamente em resposta à L-Citrulina ou L-Citrulina Malato. Por sua vez, no sóleo, apenas a L-Citrulina Malato promoveu aumento da expressão da NOS3. O aumento de NOS1 em resposta a maiores concentrações de substrato era esperado (DeMartino *et al.*, 2019). Uma vez que níveis mais altos de NO não foram observados no músculo sóleo, os resultados apontam para efeitos relacionados apenas ao Malato. A adição de Malato também induziu elevação dos níveis de HIF-1 $\alpha$ , mas esse aumento foi observado mais precocemente do que o identificado em relação à NOS3. Um mapeamento sobre o controle da expressão de NOS3, em células endoteliais, já havia identificado regiões contendo elementos de ligação para o HIF-1 $\alpha$ , (Coulet *et al.*, 2003). Dessa forma, os níveis aumentados que observamos no músculo sóleo podem ser uma resposta à alta expressão de HIF-1 $\alpha$ .

O fornecimento de Malato foi utilizado principalmente no intuito de aumentar a atividade do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT) e, dessa forma, potencializar os

efeitos sobre vias angiogênicas que demonstrassem benefícios ao funcionamento microvascular que irriga o músculo esquelético. Os resultados do presente estudo demonstraram que a expressão do gene HIF-1 $\alpha$  no músculo sóleo é rapidamente aumentada pela L-Citrulina Malato (já aos 90 min) e só posteriormente, por ambos suplementos. Em condições hipóxicas e em distúrbios do funcionamento mitocondrial, como na isquemia e distrofias musculares (Nguyen *et al.*, 2021), observa-se a regulação positiva do HIF-1 $\alpha$  (Shohet; Garcia, 2007). Em um modelo de hipóxia induzida por cloreto de cobalto, animais, previamente tratados, apresentaram maior expressão de HIF-1 e de outros genes angiogênicos sensíveis a ele (Saxena; Shukla; Bansal, 2012).

O referido estudo demonstrou que a exposição prévia a 15 dias de hipóxia melhorou a respiração aeróbia, a captação de glicose, o metabolismo oxidativo e a biogênese mitocondrial no músculo gastrocnêmio (predominantemente composto por fibras do Tipo II), demonstrando que há melhoria tanto do metabolismo glicolítico quanto oxidativo, em resposta à hipóxia. Em humanos, estudos com hipóxia aguda e crônica (Capitanio *et al.*, 2017) apontam para um fenômeno que tem sido denominado de “religação do Ciclo do Ácido Tricarbílico”, que é mediado pelo Malato citoplasmático e induz à glicólise oxidativa por vias anapleróticas (Capitanio *et al.*, 2017; Levett *et al.*, 2015). Em culturas de células, observa-se alto potencial de conversão das vias energéticas oxidativas para glicolíticas, mediadas pelo HIF-1 $\alpha$ , e que incluem redução do lactato e aumento do metabolismo glicolítico oxidativo (Leung *et al.*, 2017; Marín-Hernández *et al.*, 2009). Aqui, não observamos efeito diferencial no músculo EDL. É possível que a tolerância ao acúmulo de Malato citosólico seja mais elevada do que no sóleo, em virtude do perfil predominantemente glicolítico de suas fibras. Estudos especificamente direcionados à compreensão da regulação das vias metabólicas e sua interação com o HIF-1  $\alpha$  em músculos esqueléticos saudáveis e em repouso, ainda são escassos.

Apesar do HIF-1 $\alpha$  ser o regulador chave para a expressão do VEGF (Levett *et al.*, 2015), mesmo no sóleo, a expressão de VEGF não foi aumentada. O curso de tempo para a expressão do gene VEGF no músculo esquelético depende do tipo e da intensidade do estímulo. Em humanos, ocorre entre 2 e 4h em resposta ao exercício (Gavin *et al.*, 2004), e parece mais responsivo ao estresse mecânico, como ocorre durante a contração muscular (Brown; Hudlicka, 2003). Em condição de repouso, é possível que a ativação do VEGF via HIF-1 $\alpha$  seja mais lenta. Em animais e humanos,

a resposta do VEGF no músculo esquelético é reduzida no envelhecimento (Levett *et al.*, 2015; Ryan *et al.*, 2006; Gavin *et al.*, 2004). É possível que algum efeito da idade tenha afetado os resultados, contudo, a comparação com animais mais jovens não foi realizada neste estudo.

Nossos resultados apontam que, em músculos com predominância de fibras Tipo II, o consumo de L-Citrulina Malato induziu respostas potencializadas apenas sobre o metabolismo do óxido nítrico - vias angiogênicas não se beneficiaram mais pela adição de Malato em comparação com o consumo de L-Citrulina isolada. Já em músculos com predominância de fibras Tipo I, a adição de Malato à L-Citrulina favoreceu as vias angiogênicas de forma mais precoce. A expressão da NOS3 foi favorecida pelo consumo de L-Citrulina Malato, apenas, o que aponta para uma sinalização ainda não esclarecida entre os níveis de metabólitos e intermediários do Ciclo do Ácido Tricarboxílico e a regulação específica da NOS3.

## 8 CONCLUSÃO

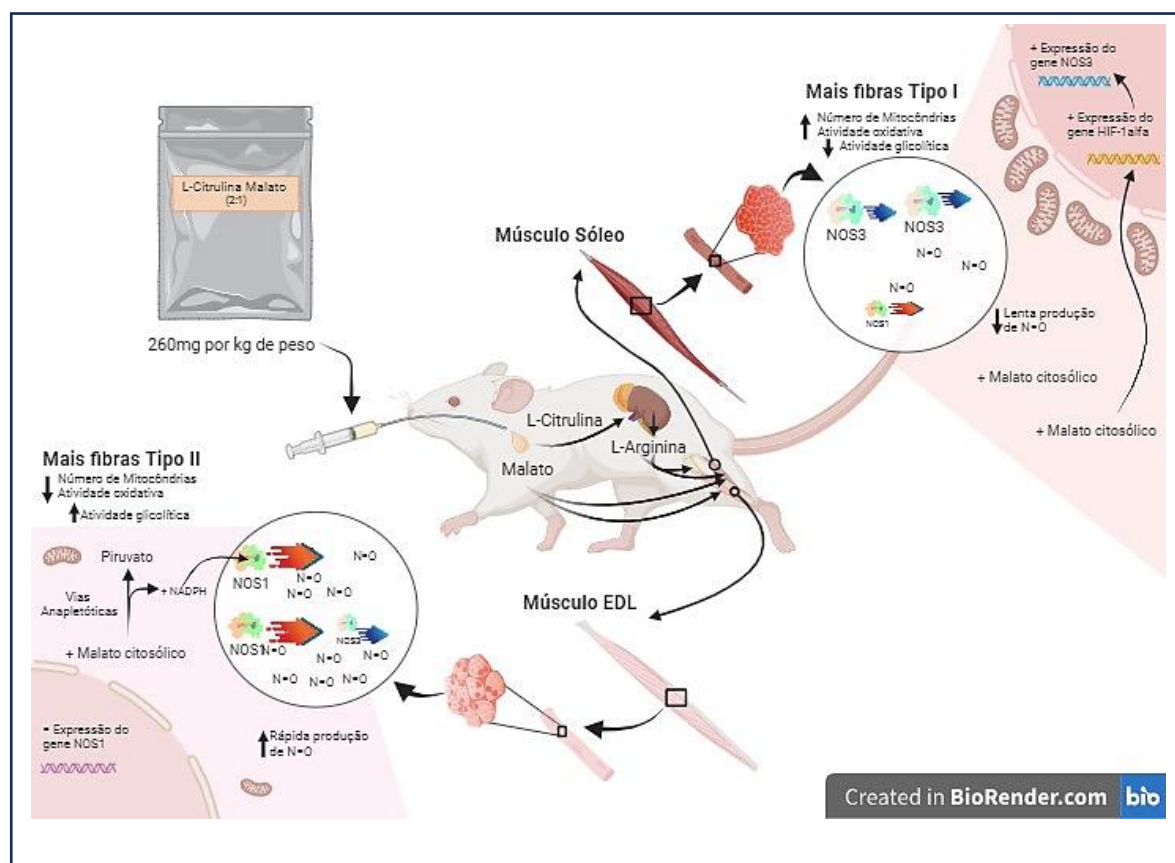
O presente estudo demonstrou que a suplementação aguda com L-Citrulina Malato potencializa o aumento do metabolismo do óxido nítrico provocado pela L-Citrulina isolada e ativa vias de angiogênese no músculo esquelético de ratos adultos, o que confirma nossa hipótese inicial. Contudo, os efeitos diferenciais são dependentes da predominância das fibras que compõem o músculo avaliado.

Aparentemente, os músculos predominantemente glicolíticos (Tipo II) são beneficiados com a suplementação aguda de L-Citrulina Malato por meio da potencialização das melhorias no metabolismo do óxido nítrico, já promovidas pela L-Citrulina. Em músculos predominantemente oxidativos (Tipo I), o metabolismo do óxido nítrico não é beneficiado de forma imediata, contudo, vias de sinalização angiogênicas são favorecidas mais precocemente pela L-Citrulina Malato. A **figura 10** apresenta uma visão geral dos efeitos diferenciais, em músculos esqueléticos predominantemente glicolítico e em oxidativos, produzidos pela ingestão de L-Citrulina Malato e os possíveis mecanismos de ação relacionados.

A atividade enzimática *per se*, os efeitos da suplementação de longo prazo, a sinergia com o exercício físico e os benefícios sobre organismos mais jovens são lacunas que as limitações do presente estudo não podem preencher, mas que abrem caminhos para pesquisas futuras.

Os resultados aqui apresentados podem contribuir para a compreensão dos mecanismos através dos quais a L-Citrulina Malato pode favorecer a saúde ou o desempenho do músculo esquelético. Estratégias que auxiliem ao envelhecimento ativo, reduzindo os impactos de desordens relacionadas ao funcionamento microvascular muscular e uma melhor atuação frente ao exercício, a partir de compostos nutricionais, são alvos relevantes para a ciência da nutrição na saúde e na atividade física.

**Figura 6 – Visão geral dos efeitos da suplementação aguda com L-Citrulina Malato e mecanismos propostos sobre o metabolismo do óxido nítrico e a expressão de genes angiogênicos em músculos esqueléticos de ratos adultos com diferentes perfis de fibras predominantes**



**FONTE: Elaborada pela autora (2024).** Resumo gráfico dos efeitos diferenciais produzidos pela ingestão aguda de L-Citrulina Malato e os possíveis mecanismos de ação relacionados. EDL: Músculo extensor longo dos dedos. EDL: Músculo extensor longo dos dedos. HIF-1α: Fator induzível por hipóxia tipo 1α. NADPH+: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfato. N=O: Óxido nítrico. NOS1: Óxido nítrico sintase tipo 1 – maior atividade enzimática; NOS3: Óxido nítrico sintase tipo 3 – menor atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SOUD, H. M.; ROUSSEAU, D. L.; STUEHR, D. J. Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. *J. Biol. Chem.*, v. 271, n. 51, p. 32515-32518, 20 dez. 1996.
- ADAK, S.; AULAK, K. S.; STUEHR, D. J. Chimeras of nitric-oxide synthase types I and III establish fundamental correlates between heme reduction, heme-NO complex formation, and catalytic activity. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n. 26, p. 23246-23252, 29 jun. 2001.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, 1 ago. 2001.
- AMARAL, Jefferson; FERREIRA, Grazielle; PINHEIRO, Lucas; MONTENEGRO, Marcelo et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. *Redox Biology*, v. 5, 31 ago. 2015.
- ANDERSEN, P.; ADAMS, R. P.; SJØGAARD, G.; THORBOE, A. et al. Dynamic knee extension as model for study of isolated exercising muscle in humans. *J. Appl. Physiol.* (1985), v. 59, n. 5, p. 1647-1653, nov. 1985.
- ANDERSEN, P.; HENRIKSSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J. Physiol.*, v. 270, n. 3, p. 677-690, set. 1977.
- ANDERSEN, P.; SALTIN, B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J. Physiol.*, v. 366, p. 233-249, set. 1985.
- ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, ago. 1977.
- BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; GHASEMI, A.; KABIR, A. et al. Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*, v. 47, p. 65-76, 1 maio 2015.
- BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine. *Acta Physiol. (Oxf.)*, v. 231, n. 3, p. e13572, mar. 2021.
- BAHRI, S.; ZERROUK, N.; AUSSEL, C.; MOINARD, C. et al. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutrition*, v. 29, n. 3, p. 479-484, mar. 2013.
- BARCROFT, H. An enquiry into the nature of the mediator of the vasodilatation in skeletal muscle in exercise and during circulatory arrest. *J. Physiol.*, v. 222, n. 2, p. 99p-118p, abr. 1972.

BAUM, O.; DA SILVA-AZEVEDO, L.; WILLERDING, G.; WÖCKEL, A. et al. Endothelial NOS is main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after prazosin administration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 287, n. 5, p. H2300-2308, nov. 2004.

BAUM, O.; HUBER-ABEL, F. A. M.; FLÜCK, M. nNOS increases fiber type-specific angiogenesis in skeletal muscle of mice in response to endurance exercise. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 11, 26 maio 2023.

BAUM, O.; VIEREGGE, M.; KOCH, P.; GÜL, S. et al. Phenotype of capillaries in skeletal muscle of nNOS-knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 304, n. 12, p. R1175-R1182, 15 jun. 2013.

BAYLIS, C.; VALLANCE, P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 7, n. 1, p. 59-62, jan. 1998.

BENDAHAN, D.; MATTEI, J. P.; GHATTAS, B.; CONFORT-GOUNY, S. et al. Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *British Journal of Sports Medicine*, v. 36, n. 4, p. 282-289, 2002.

BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U.; TUG, S.; KIRSCH, M.; FANDREY, J. Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cellular Signalling*, v. 22, n. 3, p. 349-356, mar. 2010.

BERTHE, Marie-Clotilde; DARQUY, Sylviane; BREUILLARD, Charlotte; LAMOUDI, Lynda et al. High plasma citrulline and arginine levels ensured by sustained-release citrulline supplementation in rats. *Nutrition*, v. 27, n. 11, p. 1168-1171, nov. 2011.

BESCÓS, R.; SUREDA, A.; TUR, J. A.; PONS, A. The effect of nitric-oxide-related supplements on human performance. *Sports Medicine*, v. 42, n. 2, p. 99-117, 1 fev. 2012.

BEVEGÅRD, S.; ORÖ, L. Effect of prostaglandin E1 on forearm blood flow. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 23, n. 4, p. 347-353, jun. 1969.

BLOOMER, R. J.; WILLIAMS, S. A.; CANALE, R. E.; FARNEY, T. M. et al. Acute effect of nitric oxide supplement on blood nitrate/nitrite and hemodynamic variables in resistance trained men. *Journal of Strength and Conditioning Research*, v. 24, n. 10, p. 2587-2592, out. 2010.

BLOTTNER, D.; LÜCK, G. Nitric oxide synthase (NOS) in mouse skeletal muscle development and differentiated myoblasts. *Cell and Tissue Research*, v. 292, n. 2, p. 293-302, maio 1998.

BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v. 20, n. 3, p. 48-54, maio/jun. 2014.



BONDONNO, C. P.; CROFT, K. D.; HODGSON, J. M. Dietary nitrate, nitric oxide, and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 12, p. 2036-2052, 9 set. 2016.

BRADLEY, Scott J.; KINGWELL, Bronwyn A.; CANNY, Benedict J.; MCCONELL, Glenn K. Skeletal muscle neuronal nitric oxide synthase  $\mu$  protein is reduced in people with impaired glucose homeostasis and is not normalized by exercise training. *Metabolism*, v. 56, n. 10, p. 1405-1411, out. 2007.

BRASIL. *Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica*. 1. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2023. 1017 p. ISBN 978-65-5471-037-4.

BROWN, M. D.; HUDLICKA, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis*, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2003.

CALARESU, F. R.; FAIERS, A. A.; MOGENSEN, G. J. Central neural regulation of heart and blood vessels in mammals. *Progress in Neurobiology*, v. 5, n. 1, p. 1-35, 1975.

CAPITANIO, D.; FANIA, C.; TORRETTA, E.; VIGANÒ, A. et al. TCA cycle rewiring fosters metabolic adaptation to oxygen restriction in skeletal muscle from rodents and humans. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 9723, 29 ago. 2017.

CASEY, D. P.; RANADIVE, S. M.; JOYNER, M. J. Aging is associated with altered vasodilator kinetics in dynamically contracting muscle: role of nitric oxide. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 119, n. 3, p. 232-241, 1 ago. 2015.

CHURCHWARD-VENNE, T. A.; COTIE, L. M.; MACDONALD, M. J.; MITCHELL, C. J. et al. Citrulline does not enhance blood flow, microvascular circulation, or myofibrillar protein synthesis in elderly men at rest or following exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 307, n. 1, p. E71-E83, 1 jul. 2014.

CLIFFORD, P. S.; HELLSTEN, Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 97, n. 1, p. 393-403, jul. 2004.

COBLEY, J. N.; SAKELLARIOU, G. K.; OWENS, D. J.; MURRAY, S. et al. Lifelong training preserves some redox-regulated adaptive responses after an acute exercise stimulus in aged human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 70, p. 23-32, maio 2014.

COMAS, Christiane Congro. Zoneamento agrícola de risco climático da melancia é ampliado para todas as regiões do Brasil. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59181710/zoneamento-agricola-de-risco-climatico-da-melancia-e-ampliado-para-todas-as-regioes-do-brasil#:~:text=In-forma%C3%A7%C3%B5es%20da%20AgroStat%20Brasil%2C%20do%20Minist%C3%A9rio%20da%20Agricultura%2C,representando%204%2C5%25%20das%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20de%20frutas%20do%20Brasil>. Acesso em: 27 nov. 2021.

CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S. et al. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of Immunology*, v. 166, n. 6, p. 3873-3881, 15 mar. 2001.

CORCONDILAS, A.; KOROGENIDIS, G. T.; SHEPHERD, J. T. Effect of a brief contraction of forearm muscles on forearm blood flow. *Journal of Applied Physiology*, v. 19, p. 142-146, jan. 1964.

COULET, F.; NADAUD, S.; AGRAPART, M.; SOUBRIER, F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 47, p. 46230-46240, 21 nov. 2003.

CUNNIFFE, Brian; PAPAGEORGIOU, Maria; O'BRIEN, Barbara; DAVIES, Nathan A. et al. Acute citrulline-malate supplementation and high-intensity cycling performance. *Journal of Strength and Conditioning Research*, v. 30, n. 9, p. 2638-2647, 2016.

CUTRUFELLO, P. T.; GADOMSKI, S. J.; ZAVORSKY, G. S. The effect of L-citrulline and watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. *Journal of Sports Sciences*, v. 33, n. 14, p. 1459-1466, 2015.

DAIBER, A.; MÜNDEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. *Anti-oxidants & Redox Signaling*, v. 23, n. 11, p. 899-942, 10 out. 2015.

DEMARTINO, Anthony W.; KIM-SHAPIRO, Daniel B.; PATEL, Rakesh P.; GLADWIN, Mark T. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *British Journal of Pharmacology*, v. 176, n. 2, p. 228-245, 2019.

DOWLING, P.; GARGAN, S.; SWANDULLA, D.; OHLENDIECK, K. Fiber-type shifting in sarcopenia of old age: proteomic profiling of the contractile apparatus of skeletal muscles. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, 26 jan. 2023.

EELLEN, Guy; DE ZEEUW, Pauline; TREPS, Lucas; HARJES, Ulrike et al. Endothelial cell metabolism. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 3-58, 2018.

EICH, R. F.; LI, T.; LEMON, D. D.; DOHERTY, D. H. et al. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, v. 35, n. 22, p. 6976-6983, 4 jun. 1996.

ELANGO, Rajavel. Tolerable upper intake level for individual amino acids in humans: a narrative review of recent clinical studies. *Advances in Nutrition*, v. 14, n. 4, p. 885-894, 1 jul. 2023.

FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N. et al. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB Journal*, v. 16, n. 13, p. 1775-1785, nov. 2002.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Annals of Medicine*, v. 44, n. 7, p. 694-716, nov. 2012.

FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; ANGELIS, C. D. et al. Antioxidant tempol modulates the increases in tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. *Chemico-Biological Interactions*, v. 349, p. 109658, 1 nov. 2021.

FILIPPIN, L. I.; CUEVAS, M. J.; LIMA, E.; MARRONI, N. P. et al. Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*, v. 24, n. 1, p. 43-49, 1 jan. 2011.

FRANDSEN, U.; BANGSBO, J.; LANGBERG, H.; SALTIN, B. et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by systemic N(G)-monomethyl-L-arginine administration in humans: effects on interstitial adenosine, prostacyclin and potassium concentrations in resting and contracting skeletal muscle. *Journal of Vascular Research*, v. 37, n. 4, p. 297-302, jul./ago. 2000.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research*, v. 53, n. 5, p. 557-573, nov. 1983.

FURCHGOTT, R. F. Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical relevance in diabetes. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, v. 115, n. 2, p. 317-331, 1998.

FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, v. 19, n. 4, p. 235-251, ago. 1999.

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

GAMBARDELLA, Jessica; FIORDELISI, Antonella; SPIGNO, Luca; BOLDRINI, Lorenzo et al. Effects of chronic supplementation of L-arginine on physical fitness in water polo players. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, p. 6684568-6684568, 2021.

GANTNER, B. N.; LAFOND, K. M.; BONINI, M. G. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. *Redox Biology*, v. 34, p. 101550, jul. 2020.

GARTEN, R. S.; GROOT, H. J.; ROSSMAN, M. J.; GIFFORD, J. R. et al. The role of muscle mass in exercise-induced hyperemia. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 116, n. 9, p. 1204-1209, 1 maio 2014.

GARVEY, C.; TIEP, B.; CARTER, R.; BARNETT, M. et al. Severe exercise-induced hypoxemia. *Respiratory Care*, v. 57, n. 7, p. 1154-1160, jul. 2012.

GAVIN, T. P.; ROBINSON, C. B.; YEAGER, R. C.; ENGLAND, J. A. et al. Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 96, n. 1, p. 19-24, jan. 2004.

GILLIARD, C. N.; LAM, J. K.; CASSEL, K. S.; PARK, J. W. et al. Effect of dietary nitrate levels on nitrate fluxes in rat skeletal muscle and liver. *Nitric Oxide*, v. 75, p. 1-7, 1 maio 2018.

GILLS, J. L.; GLENN, J. M.; GRAY, M.; ROMER, B. et al. Acute citrulline-malate supplementation is ineffective during aerobic cycling and subsequent anaerobic performance in recreationally active males. *European Journal of Sport Science*, v. 21, n. 1, p. 77-83, jan. 2021.

GOLUB, Aleksander S.; PITTMAN, Roland N. Bang-bang model for regulation of local blood flow. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, v. 20, n. 6, p. 455-483, 2013.

GONZÁLEZ-DOMENECH, C. M.; MUÑOZ-CHÁPULI, R. Molecular evolution of nitric oxide synthases in metazoans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 5, n. 4, p. 295-301, dez. 2010.

GONZALEZ, A. M.; TOWNSEND, J. R.; PINZONE, A. G.; HOFFMAN, J. R. Supplementation with nitric oxide precursors for strength performance: a review of the current literature. *Nutrients*, v. 15, n. 3, 28 jan. 2023.

GRIMBLE, G. K. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 6 Suppl 2, p. 1693S-1701S, jun. 2007.

GUEUGNEAU, M.; COUDY-GANDILHON, C.; MEUNIER, B.; COMBARET, L. et al. Lower skeletal muscle capillarization in hypertensive elderly men. *Experimental Gerontology*, v. 76, p. 80-88, abr. 2016.

HABERMEYER, M.; ROTH, A.; GUTH, S.; DIEL, P. et al. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 59, n. 1, p. 106-128, jan. 2015.

HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide*, v. 21, n. 2, p. 92-103, set. 2009.

HENDRICKSE, P.; DEGENS, H. The role of the microcirculation in muscle function and plasticity. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 40, n. 2, p. 127-140, jun. 2019.

HICKNER, R. C.; KEMENY, G.; MCIVER, K.; HARRISON, K. et al. Lower skeletal muscle nutritive blood flow in older women is related to eNOS protein content. *Journals of Gerontology: Series A*, v. 58, n. 1, p. 20-25, jan. 2003.

HICKNER, R. C.; KEMENY, G.; STALLINGS, H. W.; MANNING, S. M. et al. Relationship between body composition and skeletal muscle eNOS. *International Journal of Obesity (London)*, v. 30, n. 2, p. 308-312, fev. 2006.

HORD, J. M.; BOTCHLETT, R.; LAWLER, J. M. Age-related alterations in the sarcolemmal environment are attenuated by lifelong caloric restriction and voluntary exercise. *Experimental Gerontology*, v. 83, p. 148-157, out. 2016.

HORD, N. G. Dietary nitrates, nitrites, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, v. 13, n. 6, p. 484-492, dez. 2011.

HOU, E.; SUN, N.; ZHANG, F.; ZHAO, C. et al. Malate and aspartate increase L-arginine and nitric oxide and attenuate hypertension. *Cell Reports*, v. 19, n. 8, p. 1631-1639, 23 maio 2017.

HUDLICKA, O. Microcirculation in skeletal muscle. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v. 1, n. 1, p. 3-11, jan. 2011.

HUERTA OJEDA, Á.; DOMÍNGUEZ DE HANNA, A.; BARAHONA-FUENTES, G. [The effect of supplementation with L-arginine and L-citrulline on physical performance: a systematic review]. *Nutrición Hospitalaria*, v. 36, n. 6, p. 1389-1402, 26 dez. 2019.

IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circulation Research*, v. 65, n. 1, p. 1-21, jul. 1989.

ISSENBERG, P. Nitrite, nitrosamines, and cancer. *Federation Proceedings*, v. 35, n. 6, p. 1322-1326, 1 maio 1976.

JACKSON, W. F. Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor and what is the mechanism of action? *Journal of Physiology*, v. 594, n. 18, p. 5055-5077, 15 set. 2016.

JONES, A. M.; VANHATALO, A.; SEALS, D. R.; ROSSMAN, M. J. et al. Dietary nitrate and nitric oxide metabolism: mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 27 jul. 2020.

JONES, A. M.; VANHATALO, A.; SEALS, D. R.; ROSSMAN, M. J. et al. Dietary nitrate and nitric oxide metabolism: mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 53, n. 2, p. 280-294, 1 fev. 2021.

JONES, Andrew M.; FERGUSON, Scott K.; BAILEY, Stephen J.; VANHATALO, Anni et al. Fiber type-specific effects of dietary nitrate. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 44, n. 2, p. 53-60, 2016.

JOYNER, Michael J.; CASEY, Darren P. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiological Reviews*, v. 95, n. 2, p. 549-601, 2015.

KALLIOKOSKI, K. K.; LANGBERG, H.; RYBERG, A. K.; SCHEEDE-BERGDAHL, C. et al. Nitric oxide and prostaglandins influence local skeletal muscle blood flow during exercise in humans: coupling between local substrate uptake and blood flow. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 291, n. 3, p. R803-R809, set. 2006.

KAPIL, V.; KHAMBATA, R. S.; JONES, D. A.; RATHOD, K. et al. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Pharmacological Reviews*, v. 72, n. 3, p. 692-766, jul. 2020.

KIM, I. Y.; SCHÜTZLER, S. E.; SCHRADER, A.; SPENCER, H. J. 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. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 309, n. 11, p. E915-E924, 1 dez. 2015.

KISSNER, R.; NAUSER, T.; BUGNON, P.; LYE, P. G. et al. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology*, v. 10, n. 11, p. 1285-1292, nov. 1997.

KIYICI, F.; EROĞLU, H.; KISHALI, N. F.; BURMAOĞLU, G. The effect of Citrulline/Malate on blood lactate levels in intensive exercise. *Biochemical Genetics*, v. 55, n. 5-6, p. 387-394, dez. 2017.

KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDD, D. S.; STAMLER, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, v. 372, n. 6506, p. 546-548, 8 dez. 1994.

KRAMER, K.; OBAL, F.; QUENSEL, W. Untersuchungen über den Muskelstoffwechsel des Warmblüters. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, v. 241, n. 5, p. 717-729, abr. 1939.

KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin*, v. 62, n. 6, p. 505-515, 15 fev. 2004.

KUCHAN, M. J.; FRANGOS, J. A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology*, v. 266, n. 3 Pt 1, p. C628-636, mar. 1994.

KUMAR, P.; LIU, C.; HSU, J. W.; CHACKO, S. et al. Glycine and N-acetylcysteine (GlyNAC) supplementation in older adults improves glutathione deficiency, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, insulin resistance, endothelial dysfunction, genotoxicity, muscle strength, and cognition: Results of a pilot clinical trial. *Clinical Translational Medicine*, v. 11, n. 3, p. e372, mar. 2021.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, n. 3, p. 556-592, 2012.

LANCASTER, J. R., Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*, v. 1, n. 1, p. 18-30, fev. 1997.

LAUGHLIN, M. H.; ARMSTRONG, R. B. Muscle blood flow during locomotory exercise. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 13, p. 95-136, 1985.

- LEUNG, E.; CAIRNS, R. A.; CHAUDARY, N.; VELLANKI, R. N. et al. Metabolic targeting of HIF-dependent glycolysis reduces lactate, increases oxygen consumption and enhances response to high-dose single-fraction radiotherapy in hypoxic solid tumors. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 418, 15 jun. 2017.
- LEVETT, D. Z.; VIGANÒ, A.; CAPITANIO, D.; VASSO, M. et al. Changes in muscle proteomics in the course of the Caudwell Research Expedition to Mt. Everest. *Proteomics*, v. 15, n. 1, p. 160-171, jan. 2015.
- LEWIS, R. S.; DEEN, W. M. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous solutions. *Chemical Research in Toxicology*, v. 7, n. 4, p. 568-574, jul./ago. 1994.
- LIU, X.; MILLER, M. J.; JOSHI, M. S.; SADOWSKA-KROWICKA, H. et al. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 30, p. 18709-18713, 24 jul. 1998.
- LORENZO CALVO, J.; ALORDA-CAPO, F.; PAREJA-GALEANO, H.; JIMÉNEZ, S. L. Influence of nitrate supplementation on endurance cyclic sports performance: A systematic review. *Nutrients*, v. 12, n. 6, p. 1796, 2020.
- LORIN, J.; ZELLER, M.; GUILLAND, J. C.; COTTIN, Y. et al. Arginine and nitric oxide synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 58, n. 1, p. 101-116, jan. 2014.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 2, p. 156-167, fev. 2008.
- MACINTOSH, B. R.; SHAHI, M. R. A peripheral governor regulates muscle contraction. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 36, n. 1, p. 1-11, fev. 2011.
- MAGDER, S. The meaning of blood pressure. *Critical Care*, v. 22, n. 1, p. 257, 11 out. 2018.
- MAHAJ, A.; FISCHER, S. M.; DILLON, K. N.; KANG, Y. et al. Effects of L-Citrulline supplementation on endothelial function and blood pressure in hypertensive post-menopausal women. *Nutrients*, v. 14, n. 20, 20 out. 2022.
- MAPS, World. Watermelon production. 2018. Disponível em: <https://worldmap-per.org/maps/watermelon-production/>. Acesso em: 25 nov. 2018.
- MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; GALLARDO-PÉREZ, J. C.; RALPH, S. J.; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S. et al. HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 1084-1101, ago. 2009.
- MCHUGH, K. M.; DRAKE, R. L. Insulin-mediated regulation of epididymal fat pad malic enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 62, n. 2, p. 227-233, abr. 1989.

- MCVEIGH, G. E.; HAMILTON, P.; WILSON, M.; HANRATTY, C. G. et al. Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate. *Circulation*, v. 106, n. 2, p. 208-213, 9 jul. 2002.
- MICHEL, J. B. [Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system]. *Pathologie Biologie*, v. 46, n. 3, p. 181-189, mar. 1998.
- MILONE, S. D.; PACE-ASCIAC, C. R.; REYNAUD, D.; AZEVEDO, E. R. et al. Biochemical, hemodynamic, and vascular evidence concerning the free radical hypothesis of nitrate tolerance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 33, n. 5, p. 685-690, mai. 1999.
- MOINARD, C.; NICOLIS, I.; NEVEUX, N.; DARQUY, S. et al. Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *British Journal of Nutrition*, v. 99, n. 4, p. 855-862, abr. 2008.
- MÖLLER, M.; BOTTI, H.; BATTYHANY, C.; RUBBO, H. et al. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low-density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 10, p. 8850-8854, 11 mar. 2005.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, v. 12, n. 4, p. 365-372, out. 1988.
- MOON, Y.; BALKE, J. E.; MADORMA, D.; SIEGEL, M. P. et al. Nitric oxide regulates skeletal muscle fatigue, fiber type, microtubule organization, and mitochondrial ATP synthesis efficiency through cGMP-dependent mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 26, n. 17, p. 966-985, 10 jun. 2017.
- MORRISON, R. J.; MILLER, C. C., 3rd; REID, M. B. Nitric oxide effects on force-velocity characteristics of the rat diaphragm. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 119, n. 1, p. 203-209, jan. 1998.
- MORTENSEN, S. P.; GONZÁLEZ-ALONSO, J.; DAMSGAARD, R.; SALTIN, B. et al. Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. *The Journal of Physiology*, v. 581, n. Pt 2, p. 853-861, 2007.
- MUNHOZ, A.; RIVA, P.; DE JESUS, D.; CURI, R. et al. Control of insulin secretion by production of reactive oxygen species: study performed in pancreatic islets from fed and 48-hour fasted Wistar rats. *PLOS ONE*, v. 11, p. e0158166, 30 jun. 2016.
- MURGIA, M.; TONIOLO, L.; NAGARAJ, N.; CICILIOT, S. et al. Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell Reports*, v. 19, n. 11, p. 2396-2409, 13 jun. 2017.
- NGUYEN, H.; KOH, J. Y.; LI, H.; ISLAS-ROBLES, A. et al. A novel imidazolinone metformin-methylglyoxal metabolite promotes endothelial cell angiogenesis via the eNOS/HIF-1 $\alpha$  pathway. *FASEB Journal*, v. 35, n. 7, p. e21645, jul. 2021.



NGUYEN, T. H.; CONOTTE, S.; BELAYEW, A.; DECLÈVES, A. E. et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor signaling in muscular dystrophies: cause and consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, 5 jul. 2021.

NICKELS, T. J.; REED, G. W.; DRUMMOND, J. T.; BLEVINS, D. E. et al. Does nitric oxide modulate transmitter release at the mammalian neuromuscular junction? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, v. 34, n. 4, p. 318-326, abr. 2007.

NISOLI, E.; FALCONE, S.; TONELLO, C.; COZZI, V. et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 47, p. 16507-16512, 23 nov. 2004.

NYBERG, M.; BLACKWELL, J. R.; DAMSGAARD, R.; JONES, A. M. et al. Lifelong physical activity prevents an age-related reduction in arterial and skeletal muscle nitric oxide bioavailability in humans. *The Journal of Physiology*, v. 590, n. 21, p. 5361-5370, 1 nov. 2012.

PAPADIA, C.; OSOWSKA, S.; CYNOBER, L.; FORBES, A. Citrulline in health and disease: review on human studies. *Clinical Nutrition*, v. 37, n. 6 Pt A, p. 1823-1828, dez. 2018.

PARK, J. W.; THOMAS, S. M.; SCHECHTER, A. N.; PIKNOVA, B. Control of rat muscle nitrate levels after perturbation of steady state dietary nitrate intake. *Nitric Oxide*, v. 109-110, p. 42-49, 1 mai. 2021.

PERCIVAL, J. M. nNOS regulation of skeletal muscle fatigue and exercise performance. *Biophysical Reviews*, v. 3, n. 4, p. 209-217, dez. 2011.

PIEC, I.; LISTRAT, A.; ALLIOT, J.; CHAMBON, C. et al. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB Journal*, v. 19, n. 9, p. 1143-1145, jul. 2005.

PIKNOVA, B.; PARK, J. W.; KWAN JEFF LAM, K.; SCHECHTER, A. N. Nitrate as a source of nitrite and nitric oxide during exercise hyperemia in rat skeletal muscle. *Nitric Oxide*, v. 55-56, p. 54-61, 1 mai. 2016.

PIKNOVA, B.; SCHECHTER, A. N.; PARK, J. W.; VANHATALO, A. et al. Skeletal muscle nitrate as a regulator of systemic nitric oxide homeostasis. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 50, n. 1, p. 2-13, 1 jan. 2022.

PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; VILALVA, K. H.; TOLEDO, J. C. et al. Contrasting effects of low versus high ascorbate doses on blood pressure responses to oral nitrite in L-NAME-induced hypertension. *Nitric Oxide*, v. 74, p. 65-73, 1 abr. 2018.

PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C. et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, n. 4, p. 701-709, 15 ago. 2012.

POEGGELER, B.; SINGH, S. K.; SAMBAMURTI, K.; PAPPOLLA, M. A. Nitric oxide as a determinant of human longevity and health span. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 19, 26 set. 2023.

PUNKT, K.; FRITZSCHE, M.; STOCKMAR, C.; HEPP, P. et al. Nitric oxide synthase in human skeletal muscles related to defined fibre types. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 125, n. 5, p. 567-573, mai. 2006.

RAJCIC, D.; KROMM, F.; HERNÁNDEZ-ARRIAGA, A.; BRANDT, A. et al. Supplementing L-citrulline can extend lifespan in *C. elegans* and attenuate the development of aging-related impairments of glucose tolerance and intestinal barrier in mice. *Biomolecules*, v. 13, n. 11, 26 out. 2023.

RAMSEY, K. A.; BAKKER, A. J.; PINNIGER, G. J. Fiber-type dependence of stretch-induced force enhancement in rat skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, v. 42, n. 5, p. 769-777, nov. 2010.

RANATUNGA, K. W.; THOMAS, P. E. Correlation between shortening velocity, force-velocity relation and histochemical fibre-type composition in rat muscles. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 11, n. 3, p. 240-250, jun. 1990.

REZAEI, S.; GHOLAMALIZADEH, M.; TABRIZI, R.; NOWROUZI-SOHRABI, P. et al. The effect of L-arginine supplementation on maximal oxygen uptake: a systematic review and meta-analysis. *Physiological Reports*, v. 9, n. 3, p. e14739-e14739, 2021.

RHIM, Hye Chang; KIM, Sung Jong; PARK, Jewel; JANG, Ki-Mo. Effect of citrulline on post-exercise rating of perceived exertion, muscle soreness, and blood lactate levels: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Sport and Health Science*, v. 9, n. 6, p. 553-561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.02.001>. Acesso em: 3 mar. 2025.

ROGERS, J. M.; GILLS, J.; GRAY, M. Acute effects of Nitrosigine® and citrulline malate on vasodilation in young adults. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v. 17, n. 1, p. 12, 24 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12970-020-00356-7>. Acesso em: 3 mar. 2025.

RYAN, N. A.; ZWETSLOOT, K. A.; WESTERKAMP, L. M.; HICKNER, R. C. et al. Lower skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. *Journal of Applied Physiology*, v. 100, n. 1, p. 178-185, jan. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01009.2005>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SANDER, J. Formation of carcinogenic nitroso compounds in the stomach of laboratory animals and the consequences for man. 3. *Arzneimittelforschung*, v. 21, n. 12, p. 2034-2039, dez. 1971.

SANDER, J. The importance of nitrate, nitrite and amines in water for development of carcinogenic N-nitroso compounds. *Schriftenreihe für Wasser-, Boden- und Lufthygiene*, v. 40, p. 67-78, 1973.

SANSBURY, B. E.; CUMMINS, T. D.; TANG, Y.; HELLMANN, J. et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. *Circulation Research*, v. 111, n. 9, p. 1176-1189, 12 out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.270888>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SAXENA, Saurabh; SHUKLA, Dhananjay; BANSAL, Anju. Augmentation of aerobic respiration and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by hypoxia preconditioning with cobalt chloride. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 324-334, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.010>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SCHOORS, S.; BRUNING, U.; MISSIAEN, R.; QUEIROZ, K. C. et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature*, v. 520, n. 7546, p. 192-197, 9 abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14287>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SCHRAGE, William G.; WILKINS, Brad W.; JOHNSON, Christopher P.; EISENACH, John H. et al. Roles of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in leg vasodilation and oxygen consumption during prolonged low-intensity exercise in untrained humans. *Journal of Applied Physiology*, v. 109, n. 3, p. 768-777, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00069.2010>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SCHWEDEHELM, E.; MAAS, R.; FREESE, R.; JUNG, D. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 65, n. 1, p. 51-59, jan. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03092.x>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SHOHET, R. V.; GARCIA, J. A. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*, v. 85, n. 12, p. 1309-1315, dez. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0279-6>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SIMINO, L. A. P.; FONTANA, M. F.; DE FANTE, T.; PANZARIN, C. et al. Hepatic epigenetic reprogramming after liver resection in offspring alleviates the effects of maternal obesity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 830009, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.830009>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SIMMEN, F. A.; ALHALLAK, I.; SIMMEN, R. C. M. Malic enzyme 1 (ME1) in the biology of cancer: it is not just intermediary metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 65, n. 4, p. R77-R90, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JME-20-0106>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SOCHA, M. J.; SEGAL, S. S. Microvascular mechanisms limiting skeletal muscle blood flow with advancing age. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 125, n. 6, p. 1851-1859, 1 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00593.2018>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SPARACINO-WATKINS, Courtney E.; LAI, Yen-Chun; GLADWIN, Mark T. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in pulmonary arterial hypertension therapeutics. *Circulation*, v. 125, n. 23, p. 2824-2826, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114581>. Acesso em: 3 mar. 2025.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 1, p. 209-237, jan. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.209>. Acesso em: 3 mar. 2025.

STREETER, Daniel M.; TRAUTMAN, Kara A.; BENNETT, Tylor W.; McINTOSH, Lauren E. et al. Endothelial, cardiovascular, and performance responses to L-arginine intake and resistance exercise. *International Journal of Exercise Science*, v. 12, n. 2, p. 701-713, 2019. Disponível em: <https://digitalcommons.wku.edu/ijes/vol12/iss2/15>. Acesso em: 3 mar. 2025.

STUEHR, D. J.; GRIFFITH, O. W. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 65, p. 287-346, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9780470123037.ch6>. Acesso em: 3 mar. 2025.

SUREDA, A.; PONS, A. Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise: ergogenic nutrients? *Medicine and Sport Science*, v. 59, p. 18-28, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000338342>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TANAKA, Y.; YAMAKI, F.; KOIKE, K.; TORO, L. New insights into the intracellular mechanisms by which PGI<sub>2</sub> analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel. *Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents*, v. 2, n. 3, p. 257-265, jul. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1568016043405164>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TARONI, F.; DI DONATO, S. Purification and properties of cytosolic malic enzyme from human skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry*, v. 20, n. 8, p. 857-866, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(88\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(88)90074-4). Acesso em: 3 mar. 2025.

THOMAS, D. D.; LIU, X.; KANTROW, S. P.; LANCASTER, J. R., Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 1, p. 355-360, 2 jan. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.011413798>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TORRES, S. H.; DE SANCTIS, J. B.; DE BRICENO, L. M.; HERNANDEZ, N. et al. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Journal of Endocrinology*, v. 181, n. 3, p. 419-427, 1 jun. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1677/joe.0.1810419>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TREXLER, E. T.; PERSKY, A. M.; RYAN, E. D.; SCHWARTZ, T. A. et al. Acute effects of citrulline supplementation on high-intensity strength and power performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, v. 49, n. 5, p. 707-718, mai. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01111-4>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radical Research*, v. 39, n. 8, p. 797-815, ago. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10715760500308551>. Acesso em: 3 mar. 2025.

TSUKAHARA, H.; GORDIENKO, D. V.; TONSHOFF, B.; GELATO, M. C. et al. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney International*, v. 45, n. 2, p. 598-604, fev. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ki.1994.87>. Acesso em: 3 mar. 2025.

VAN FAASSEN, E. E.; BAHRAMI, S.; FEELISCH, M.; HOGG, N. et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Medical Research Reviews*, v. 29, n. 5, p. 683-741, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.20156>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WANG, Y.; EL-ZARU, M. R.; SURKS, H. K.; MENDELSON, M. E. Formin homology domain protein (FHOD1) is a cyclic GMP-dependent protein kinase I-binding protein and substrate in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 23, p. 24420-24426, 4 jun. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M401134200>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WELCH, Hugh G.; STAINSBY, Wendell N. Oxygen debt in contracting dog skeletal muscle in situ. *Respiration Physiology*, v. 3, n. 2, p. 229-242, 1 out. 1967. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(67\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(67)90079-5). Acesso em: 3 mar. 2025.

WIGSTON, D. J.; ENGLISH, A. W. Fiber-type proportions in mammalian soleus muscle during postnatal development. *Journal of Neurobiology*, v. 23, n. 1, p. 61-70, fev. 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/neu.480230106>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WIJNANDS, K. A.; VINK, H.; BRIEDÉ, J. J.; VAN FAASSEN, E. E. et al. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLOS ONE*, v. 7, n. 5, p. e37439, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037439>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WILSON, J. R.; KAPOOR, S. C. Contribution of prostaglandins to exercise-induced vasodilation in humans. *American Journal of Physiology*, v. 265, n. 1 Pt 2, p. H171-H175, jul. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.1.H171>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WONG, S. A.; DROVANDI, A.; JONES, R.; GOLLEDGE, J. Effect of dietary supplements which upregulate nitric oxide on walking and quality of life in patients with peripheral artery disease: A meta-analysis. *Biomedicine*, v. 11, n. 7, 29 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicine11071862>. Acesso em: 3 mar. 2025.

WU, G.; MORRIS, S. M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, v. 336, Pt 1, n. Pt 1, p. 1-17, 15 nov. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3360001>. Acesso em: 3 mar. 2025.

YANG, B. K.; VIVAS, E. X.; REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. *Free Radical Research*, v. 37, n. 1, p. 1-10, jan. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1071576031000070855>. Acesso em: 3 mar. 2025.

YOKOM, A. L.; MORISHIMA, Y.; LAU, M.; SU, M. et al. Architecture of the nitric-oxide synthase holoenzyme reveals large conformational changes and a calmodulin-driven release of the FMN domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 24, p. 16855-16865, 13 jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567106>. Acesso em: 3 mar. 2025.

ZACHARIA, I. G.; DEEN, W. M. Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, n. 2, p. 214-222, fev. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10462-005-0010-9>. Acesso em: 3 mar. 2025.

## ANEXO A – PARECER CEUA UFPE 1



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife – PE – Brasil  
 Fone: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 02 de julho de 2021

Ofício nº 39/21

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

**Prof. Carol Virginia Góes Leandro**

Centro Acadêmico de Vitória

Departamento de Nutrição

processo nº0022/2021

Certificamos que a proposta intitulada " **Avaliação de Dois Protocolos de Suplementação Oral de Citrulina-Malato Sobre a Tolerância ao Exercício, Reatividade Vascular e à Expressão de Genes Relacionados à Vasodilatação, Angiogênese e ao Metabolismo Oxidativo Mitocondrial no Músculo Esquelético de Ratos Treinados**", registrado com o nº0022/2021 sob a responsabilidade da **Prof. Carol Virginia Góes Leandro** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/06/2021

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Finalidade                          | ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica                     |
| Vigência da autorização             | 01/07/2021 a 01/08/2023                                |
| Espécie/linhagem/raça               | <i>Rattus norvegicus</i> (ratos wistar) Rato isogênico |
| Nº de animais                       | 100  |
| Peso/idade                          | 220 a 250 g / 90 dias                                  |
| Sexo                                | (100) macho  |
| Origem: Biotério de Criação         | Biotério do Departamento de Nutrição                   |
| Destino: Biotério de Experimentação | Biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV), UFPE    |

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva  
 -Presidente CEUA/UFPE  
 SIAPE 2343691

**ANEXO B – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-CITRULINA**





## CERTIFICADO DE ANÁLISES 179/21

INSUMO: L CITRULINA

NOME QUÍMICO: (S)-2-Amino-5-ureidopentanoic acid

DCB: 02190

FÓRMULA MOLECULAR: C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

LOTE FABRICANTE: 21030913

ORIGEM: China

FABRICAÇÃO: 09/03/2021

CAS: 372-75-8

PESO MOLECULAR: 175,19 g/mol

LOTE PRODUÇÃO: 0327/0521

FABRICANTE: Changsha Huir Biological-Tech

VALIDADE: 08/03/2023

| ANÁLISE                              | MÉTODO                      | ESPECIFICAÇÃO               | RESULTADOS  | REFERÊNCIA |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|------------|
| Descrição                            | Visual                      | Pó branco                   | Conforme*   | Fabricante |
| Identificação                        | Reação colorimétrica        | De acordo com os requisitos | Conforme**  | Fabricante |
| Teor (base seca)                     | Kjeldahl                    | 98,5 - 101,0 %              | 99,4 %**  | Fabricante |
| Solubilidade                         | FB 6<br><Solubilidade>      | Informativo                 | Moderadamente solúvel em água; Insolúvel em etanol* | -          |
| Densidade aparente                   | Densímetro                  | Informativo                 | 0,68 g/cm <sup>3</sup> *                            | -          |
| pH                                   | Solução aquosa a 10 % (m/V) | 5,0 - 7,0                   | 5,78*   | Fabricante |
| Perda por dessecação                 | 1 g/105°C/3 h               | ≤ 0,20 %                    | 0,13 %*   | Fabricante |
| Cinzas sulfatadas                    | 1 g/550°C/3 h               | ≤ 0,10 %                    | 0,03 %*   | Fabricante |
| Estado da solução                    | AJI 92 [2]                  | ≥ 98,0 %                    | 99,1 %**  | Fabricante |
| Rotação específica                   | AJI 92 [1]                  | + 24,5° ~ + 26,8°           | + 25,3°**   | Fabricante |
| Metais pesados                       | AJI 92 [7]                  | ≤ 10 ppm                    | Conforme**  | Fabricante |
| Ferro                                | AJI 92 [6]                  | ≤ 10 ppm                    | Conforme**  | Fabricante |
| Arsênio                              | AJI 92 [8]                  | ≤ 1 ppm                     | Conforme**  | Fabricante |
| Cloreto                              | AJI 92 [3]                  | ≤ 0,02 %                    | Conforme**  | Fabricante |
| Sulfato                              | AJI 92 [5]                  | ≤ 0,02 %                    | Conforme**  | Fabricante |
| Amônia                               | AJI 92 [4]                  | ≤ 0,02 %                    | Conforme**  | Fabricante |
| Impureza individual                  | Fabricante                  | ≤ 0,1 %                     | Conforme**  | Fabricante |
| Impurezas totais                     | Fabricante                  | ≤ 2,0 %                     | Conforme**  | Fabricante |
| Delta acetilornitina                 | Fabricante                  | ≤ 0,5 %                     | Conforme**  | Fabricante |
| Contagem total de bactérias aeróbias | FB 6 <5.5.3.1.2>            | ≤ 10 <sup>3</sup> UFC/g     | Conforme*   | FB 6       |
| Contagem total de fungos             | FB 6 <5.5.3.1.2>            | ≤ 10 <sup>2</sup> UFC/g     | Conforme*   | FB 6       |
| <i>E. coli</i>                       | FB 6 <5.5.3.1.3>            | Ausente                     | Conforme*   | FB 6       |
| <i>S. aureus</i>                     | FB 6 <5.5.3.1.3>            | Ausente                     | Conforme*   | FB 6       |
| <i>P. aeruginosa</i>                 | FB 6 <5.5.3.1.3>            | Ausente                     | Conforme*   | FB 6       |
| <i>Salmonella</i>                    | FB 6 <5.5.3.1.3>            | Ausente                     | Conforme*   | Fabricante |

\*Resultado obtido no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.



**\*\*Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante**

**Conclusão**

(X) Aprovado

( ) Reprovado

**Armazenamento:** Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade.

**Luis G. Ferreira**  
Diretor Técnico  
CRF/SC 5378

**Aline Buttchevitz**  
CRF/SC 13616

**Marina A. Sperandio**  
CRF/SC 9644

**Camila F. Konell**  
CRF/SC 11435

Palhoça, 19 de Abril de 2021.

**ANEXO C – CERTIFICADO DE QUALIDADE DA L-CITRULINA MALATO 2:1**



## CERTIFICADO DE ANÁLISES 386/21

INSUMO: L CITRULINA DL MALATO 2:1

NOME QUÍMICO: Ácido-2-amino-5- (carbamoilamino) pentanóico: ácido 2-hidroxitributanodioico (2:1)

FÓRMULA MOLECULAR: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub> CAS: 952042-42-1 PESO MOLECULAR: 484,45 g/mol

ORIGEM: China

FABRICANTE: Changsha Huir Biological-Tech

LOTE FABRICANTE: 21032514

LOTE PRODUÇÃO:

FABRICAÇÃO: 25/03/2021

VALIDADE: 24/03/2023

| ANÁLISE                              | MÉTODO                    | ESPECIFICAÇÃO           | RESULTADOS  | REFERÊNCIA |
|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------|---|------------|
| Descrição                            | Visual                    | Pó fino branco          | Conforme *  | Fabricante |
| Teor                                 |                           |                         |   |            |
| L Citrulina DL Malato 2:1            | HPLC                      | ≥ 98,5 %                | 98,65 % **  | Fabricante |
| L Citrulina                          | HPLC                      | 62,5 - 74,2 %           | 64,88 % **  |            |
| DL Malato                            | Titulação                 | 25,8 - 37,5 %           | 33,77 % **  |            |
| Solubilidade                         | FB 6 <Solubilidade>       | Informativo             | Facilmente solúvel em água; Insolúvel em etanol * | -          |
| Densidade aparente                   | Densímetro                | Informativo             | 0,60 g/cm <sup>3</sup> *                          | -          |
| Perda por dessecação                 | 1 g/105 °C/5 h            | ≤ 5,0 %                 | 4,38 % *  | Fabricante |
| Cinzas sulfatadas                    | 1 g/800 °C/peso constante | ≤ 0,1 %                 | 0,01 % *  | Fabricante |
| Rotação específica                   | USP <781S>                | +16,5° ~ +18,5°         | +17,7° **   | Fabricante |
| Metais pesados                       | USP <231>                 | ≤ 10 ppm                | Conforme **                                       | Fabricante |
| Arsênio                              | USP <211>                 | ≤ 1 ppm                 | Conforme **                                       | Fabricante |
| Chumbo                               | USP <251>                 | ≤ 3 ppm                 | Conforme **                                       | Fabricante |
| Cádmio                               | USP <261>                 | ≤ 1 ppm                 | Conforme **                                       | Fabricante |
| Mercúrio                             | USP <261>                 | ≤ 1 ppm                 | Conforme **                                       | Fabricante |
| Ferro                                | USP <241>                 | ≤ 10 ppm                | Conforme **                                       | Fabricante |
| Cloretos                             | USP <221>                 | ≤ 0,05 %                | Conforme *  | Fabricante |
| Sulfatos                             | USP <221>                 | ≤ 0,02 %                | Conforme **                                       | Fabricante |
| Contagem total de bactérias aeróbias | FB 6 <5.5.3.1.2>          | ≤ 10 <sup>3</sup> UFC/g | Conforme *  | FB 6       |
| Contagem total de fungos             | FB 6 <5.5.3.1.2>          | ≤ 10 <sup>2</sup> UFC/g | Conforme *  | FB 6       |
| <i>E. coli</i>                       | FB 6 <5.5.3.1.3>          | Ausente                 | Conforme *  | FB 6       |
| <i>Salmonella</i>                    | FB 6 <5.5.3.1.3>          | Ausente                 | Conforme *  | Fabricante |
| <i>S. aureus</i>                     | FB 6 <5.5.3.1.3>          | Ausente                 | Conforme *  | FB 6       |
| <i>P. aeruginosa</i>                 | FB 6 <5.5.3.1.3>          | Ausente                 | Conforme *  | FB 6       |

\*Resultado obtido no Laboratório de Controle de Qualidade Active Pharmaceutica.

\*\*Resultado transcrito conforme laudo original do fabricante.

### Conclusão

(X) Aprovado

( ) Reprovado

**Armazenamento:** Conservar em recipientes bem fechados ao abrigo de luz, calor e umidade.



**Active Pharmaceutica**  
IMPORTADORA E DISTRIBUIDORA DE INSUMOS FARMACÉUTICOS

**Luis G. Ferreira**  
Diretor Técnico  
CRF/SC 5378

**Aline Buttchevitz**  
CRF/SC 13616

**Marina A. Sperandio**  
CRF/SC 9644

**Camila F. Konell**  
CRF/SC 11435

Palhoça, 12 de Julho de 2021.

# **APÊNDICE 1 – LISTA DE PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR**

| <b>Gene alvo</b>                | <b>Sequência <i>sense</i></b> | <b>Sequência <i>antisense</i></b> |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <b>NOS1</b>                     | TGGCAACAGCGACAATTTGA          | CACCCGAAGACCAGAACCAT              |
| <b>NOS3</b>                     | CCGGCGCTACGAAGAATG            | CAGTGCCACGGATGGAAATT              |
| <b>VEGF</b>                     | AGGCCGAAGTCTGTTTGCCTGC        | TCAGGGCCAGGGATGGGTTTGT            |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | CCCTACTATGTCGCTTTCTTGG        | GTTTCTGCTGCCTTGTATGGG             |
| <b><math>\beta</math>-actin</b> | AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA      | ACCAGAGGCATACAGGGACAA             |

**APÊNDICE 2 – ARTIGO 1**

Artigo original a ser submetido à revista Nitric Oxide  
Qualis CAPES Nutrição: A2 - Fator de Impacto: 3.9

**Increased nitric oxide metabolism and expression of NOS1 and HIF-1 $\alpha$  genes after acute supplementation of L-Citrulline or L-Citrulline Malate: differences between EDL and soleus muscles**

Ana Paula da Fonseca Arcoverde-Mello<sup>1,2,6</sup>, Jonnathan Vinnycius Bento da Silva<sup>2</sup>, Mirelly Cunha da Silva<sup>2,3</sup>, Wellington Francisco Pereira da Silva<sup>2</sup>, Sidiane Barros da Silva<sup>2,3</sup>, Bertuzzi, R.<sup>4</sup>, Thyago Moreira de Queiroz<sup>2,3</sup>, Laís Angélica de Paula Simino<sup>5</sup>, Adriana Souza Torsoni<sup>5</sup>, Sandra de Oliveira Conde Tella<sup>6</sup>, José Eduardo Tanus dos Santos<sup>6</sup>, Carol Virgínia Gois Leandro<sup>1</sup>, Adriano Eduardo Lima-Silva<sup>7\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Nutrition, Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco/UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>2</sup> Research Group on Cardiovascular Physiology and Pharmacology, Department of Nutrition, Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco/UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>3</sup> Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco/UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>4</sup> Human Performance Research Group, Federal University of Technology Parana, Curitiba, Parana, Brazil.

<sup>5</sup> Laboratory of Metabolism Disorders, Faculty of Applied Sciences, University of Campinas/UNICAMP, Limeira, São Paulo.

<sup>6</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo/USP, São Paulo, Brazil.

<sup>7</sup> Human Performance Research Group, Department of Physical Education, Federal Technological University of Paraná/UTFPR, Curitiba, Paraná, Brazil.

\* Correspondence: *Adriano Eduardo Lima-Silva (limasilvae@hotmail.com)*

**Abstract**

**Background:** L-Citrulline Malate has been used to increase vascularization through NO levels and its reflex effects on oxidative metabolic signaling, but its acute effects on NO



metabolism and angiogenic pathway in skeletal muscle composed of different types of muscle fibers have not been reported.

**Objective:** To understand the effects of acute L-Citrulline Malate supplementation vs. L-Citrulline in nitric oxide metabolism and in the regulation of angiogenic genes in the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles of adult rats.

To understand the effects of acute L-Citrulline Malate supplementation vs. L-Citrulline on NO metabolism and regulation of angiogenic genes in the EDL and soleus muscles of adult rats.

**Methods:** Forty-eight male Wistar rats (210 days old/ $390 \pm 29$  g) were randomized to Control (not supplemented), Vehicle (water gavage), L-Citrulline (170 mg per kg of animal weight) or L-Citrulline Malate (170 mg L-Citrulline: 86 mg Malate per kg of animal weight). Nitrite and nitrate were measured in plasma, while levels of nitrite, nitrate, nitrous compounds and the expression of NOS1, NOS3, HIF-1 $\alpha$  and VEGF genes were measured in the EDL and soleus. All parameters were evaluated at 90 minutes and 270 minutes after ingestion. In plasma: at 90 min, L-Citrulline or L-Citrulline Malate increased plasma nitrite levels ( $p = 0.0214$ ).

**Results:** In muscle, NO metabolites were only changed in EDL: at 90 min, L-Citrulline and L-Citrulline Malate increased NO metabolites, but L-Citrulline Malate was superior to all other groups in nitrite ( $p = 0.0146$ ) and nitrate ( $p = 0.0004$ ). At 270 min, L-Citrulline or L-Citrulline Malate increased the levels of nitrous compounds ( $p < 0.0001$ ) and the expression of the NOS1 gene ( $p = 0.0001$ ). In the soleus, at 90 min, only HIF-1 $\alpha$  levels increased ( $p < 0.0001$ ). At 270 min, only L-Citrulline Malate NOS3 ( $p < 0.05$ ) and both L-

Citrulline and L-Citrulline Malate increased HIF1- $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ). VEGF was not affected by any supplementation at any time.

**Conclusions:** The addition of Malate to L-Citrulline potentiated the increase in NO metabolites and the expression of NOS1 in the EDL muscle. In the soleus, both supplements increase the expression of the HIF-1 $\alpha$  gene, but L-Citrulline Malate increases HIF-1 $\alpha$  more quickly than L-Citrulline alone. L-Citrulline Malate increases the expression of the NOS3 gene.

**Abbreviations:**

**Keywords:** angiogenic genes; nitric oxide synthase; nitric oxide; vasodilator supplements.

## Introduction

Tissue vascularization occurs through mechanisms of vasodilation, vasoconstriction and alterations in blood flow, and aims to provide tissue metabolic needs (Hendrickse; Degens, 2019) In particular, vasodilation is controlled by increasing adenosine and adenosine triphosphate (ATP) molecules, prostaglandins, and nitric oxide (NO) production ((Joyner; Casey, 2015; Socha; Segal, 2018) NO is a reactive nitrogen molecule with a stable diatomic radical and high diffusion rate in aqueous saline solutions (Lancaster, 1997; Liu; Miller; Joshi; Sadowska-Krowicka *et al.*, 1998; Thomas; Liu; Kantrow; Lancaster, 2001; Zacharia; Deen, 2005) and lipids (Möller; Botti; Batthyany; Rubbo *et al.*, 2005; Zacharia; Deen, 2005) with a high capacity to diffuse and propagate its signal through cell membranes (DeMartino; Kim-Shapiro; Patel; Gladwin, 2019)

75 However, the lifetime of NO in a biological environment is very limited due to its high  
76 capacity to react with superoxide anion (Kissner; Nauser; Bugnon; Lye *et al.*, 1997), oxy-  
77 hemoglobin (Eich; Li; Lemon; Doherty *et al.*, 1996) and oxygen (Lewis; Deen, 1994) This  
78 characteristic means that the quantification of NO in tissues is usually performed indi-  
79 rectly, through the quantification of its metabolites nitrate and nitrite (Tsikas, 2005)

80 NO is mainly produced by nitric oxide (NOS) synthesizing enzymes (Stuehr;  
81 Griffith, 1992) a family of enzymes present in all mammals (Stuehr; Griffith, 1992), con-  
82 sisting of four protein domains, two catalytic and two regulatory (Gantner; LaFond; Bonini,  
83 2020) The catalytic domains are composed of the oxygenase domain, with sites for heme,  
84 tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) and L-Arginine, where NO production occurs, and the reduc-  
85 tase domain, with binding sites for NADPH, which serves as an electron source, and for  
86 the two electron transporters - flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleo-  
87 tide (FMN) (Gantner; LaFond; Bonini, 2020) The regulatory domains of NOS exhibit di-  
88 versity among isoenzymes and are composed of an oxygenase-reductase hinge, which  
89 controls the flow of electrons from the reductase to the oxygenase domain, and the  
90 PSD/Disc-Large/ZO-1 (PDZ) domain, which alters the subcellular location of the enzyme,  
91 present only in NOS1 (Gantner; LaFond; Bonini, 2020; Stuehr; Griffith, 1992)(Gantner,  
92 2020 #490). The process is initiated by NADPH, present in reductase, which releases  
93 electrons by conversion to NADP. The released electrons reduce the FAD, which donates  
94 electrons to FMN. The production of NO takes place in the area of oxygenase: the heme-  
95 BH<sub>4</sub> group receives electrons from the FMN and passes them on to molecular oxygen  
96 that oxidizes L-Arginine and transforms it into N-hydroxyarginine. Oxygenation of this in-  
97 termediate compound converts it into L-Citrulline and releases NO (Alderton; Cooper;

98 Knowles, 2001; Yokom; Morishima; Lau; Su *et al.*, 2014(Alderton, 2001 #33). In the kid-  
99 neys, L-Citrulline can be reconverted to L-Arginine and feed back into NO production.

100       There are three isoforms of NOS: NOS1 (neuronal NOS), NOS2 (inducible NOS),  
101 and NOS3 (endothelial NOS) (González-Domenech; Muñoz-Chápuli, 2010). NOS1 and  
102 NOS3 are the most abundant in skeletal muscle and are constitutive, while NOS2 is in-  
103 ducible (Alderton; Cooper; Knowles, 2001; Hickner; Kemeny; Stallings; Manning *et al.*,  
104 2006; Percival, 2011) The regulation of enzymatic activity and expression of NOS1 and  
105 NOS3 genes in muscle is highly complex, mediated by mechanisms that include the avail-  
106 ability of substrates (DeMartino; Kim-Shapiro; Patel; Gladwin, 2019) Ca<sup>2+</sup> concentra-  
107 tions, physical exercise (Baum; Huber-Abel; Flück, 2023) injury (Filippin; Cuevas; Lima;  
108 Marroni *et al.*, 2011), shear forces (Baum; Da Silva-Azevedo; Willerding; Wöckel *et al.*,  
109 2004), diet (Sansbury; Cummins; Tang; Hellmann *et al.*, 2012)mechanisms of transcrip-  
110 tional, translational, and post-translational protein-protein regulation (Stamler; Meissner,  
111 2001) in addition to the product itself, NO (Abu-Soud; Rousseau; Stuehr, 1996; Connelly;  
112 Palacios-Callender; Ameixa; Moncada *et al.*, 2001).

113       Once released into skeletal muscle, NO engages in multiple processes ranging  
114 from cell differentiation (Blottner; Lück, 1998), tissue repair (Filippin; Cuevas; Lima;  
115 Marroni *et al.*, 2011), substrate metabolism (Kalliokoski; Langberg; Ryberg; Scheede-  
116 Bergdahl *et al.*, 2006), energy production, contraction and force production (Kobzik; Reid;  
117 Bredt; Stamler, 1994) mitochondrial biogenesis (Nisoli; Falcone; Tonello; Cozzi *et al.*,  
118 2004), fatigue strength (Moon; Balke; Madorma; Siegel *et al.*, 2017). The levels of NO  
119 and NOS in the muscle are reduced in conditions of obesity (Bradley; Kingwell; Canny;  
120 McConell, 2007) altered glucose metabolism (Torres; De Sanctis; de Briceno; Hernandez

*et al.*, 2004) and aging (Casey; Ranadive; Joyner, 2015; Hickner; Kemeny; McIver; Harrison *et al.*, 2003; Nyberg; Blackwell; Damsgaard; Jones *et al.*, 2012).

In humans (Dowling; Gargan; Swandulla; Ohlendieck, 2023; Murgia; Toniolo; Nagaraj; Ciciliot *et al.*, 2017(Dowling, 2023 #534) and in animals (Piec; Listrat; Alliot; Chambon *et al.*, 2005) functional and morphological reduction of fast-twitch fibers, changes in the content and activity of NOS linked to aging have been observed (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990) These alterations may originate, in part, in an inefficient vascularization (Gueugneau; Coudy-Gandilhon; Meunier; Combaret *et al.*, 2016) and mitochondrial dysfunctions (Kumar; Liu; Hsu; Chacko *et al.*, 2021) that hinder the physiological maintenance of skeletal muscle (Baum; Huber-Abel; Flück, 2023; Baum; Vieregge; Koch; Gül *et al.*, 2013). NOS1 content is higher in fast-twitch muscles (Punkt; Fritzsche; Stockmar; Hepp *et al.*, 2006) and is reduced in aging (Hord; Botchlett; Lawler, 2016) NOS3 content is higher in slow-twitch muscles (Kobzik; Reid; Bredt; Stamler, 1994; Stamler; Meissner, 2001) and is increased in human aging (Cobley; Sakellariou; Owens; Murray *et al.*, 2014).

The established evidence of the relationship between NO and skeletal muscle (Morrison; Miller; Reid, 1998; Nickels; Reed; Drummond; Blevins *et al.*, 2007) have led to a growing number of studies using substances that increase their endogenous levels and favor physiological functions related to adequate vascularization, maintenance of muscle mass and improvements in skeletal muscle performance during exercise (Gonzalez; Townsend; Pinzone; Hoffman, 2023; Wong; Drovandi; Jones; Golledge, 2023). The studies list the consumption of substances that stimulate the production of NO by NOS dependent and independent pathways (Bloomer; Williams; Canale; Farney *et al.*, 2010).

In the scope of substances that stimulate NOS-dependent pathways, L-Citrulline Malate initially demonstrated advantages: high bioavailability, high tolerability, rare adverse effects, lactate *clearance* via the urea cycle, vasorelaxation via NO, and better oxidative metabolism via exogenous supply of malate to the Tricarboxylic Acid Cycle (Gonzalez; Townsend; Pinzone; Hoffman, 2023) However, the vast majority of studies produced have focused on analyses in the field of performance (Cutrufello; Gadomski; Zavorsky, 2015; Rhim; Kim; Park; Jang, 2020). Since the activity and expression of NOS can be regulated by substrates and also by NO as a product, it is relevant to investigate the impact of oral L-Citrulline supplementation on skeletal muscle. Another point that was sought in this study is the understanding of how malate acts on pathways that favor angiogenesis, since, in endothelial cells, the activation of oxidative pathways is necessary for vascularization by new vessels, but we do not know if the behavior is the same in skeletal muscle cells (Schoors; Bruning; Missiaen; Queiroz *et al.*, 2015).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of acute oral supplementation of L-Citrulline and L-Citrulline Malate on muscle metabolites of NO and expression of NOS1, NOS3, HIF-1 $\alpha$  and VEGF genes of EDL and soleus muscles of rats. The hypothesis is that acute oral supplementation with L-Citrulline Malate potentiates the increase in nitric oxide metabolism caused by isolated L-Citrulline and activates angiogenesis pathways in the skeletal muscle of adult rats and that and angiogenic signaling in muscles with a predominant composition of Type I fibers is more responsive to L-Citrulline Malate supplementation than muscles with more Type II fibers.

## 2 Methods

## 2.1 Ethical issues

The study was carried out in accordance with the standards of the Brazilian Guide-line for the Care and Use of Animals for Scientific and Didactic Purposes of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and guidelines from the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The project was submitted and approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Federal University of Pernambuco – CEUA/UFPE (protocol nr. 0022/2021).

## 2.2 Animals

Forty-eight male Wistars rats (*Rattus norvegicus* - 21 days old) were obtained from the colony at Nutrition Department and maintained on *bioterium* of Academic Center of Vitória of Federal University of Pernambuco (UFPE) at 210 days old, to guarantee the same environmental conditions (12 h light/dark cycle, room temperature between 22–25 ° and free access to water and food (Nuvilab-CR1®, NUVITAL, Curitiba, Brazil). At 210 days old, the animals (390 g  $\pm$  29 g) were balanced allocated into four groups, considering original litter and body weight.

## 2.3 Experimental design

The four experimental groups were designated as follows: Control, were animals subjected only to the same environment and acclimatization time as the other groups; Vehicle, were animals that would only drink ultrapure water; L-Citrulline, were animals that would receive L-Citrulline supplementation; L-Citrulline Malate, were animals that would receive L-Citrulline Malate supplementation (2:1). After ingestion, the animals have

dead induced and tissues collected in two moments: 90 minutes after and 270 minutes after, to ensure the observation of effects on metabolites and expression of interest genes in this study.

## 2.4 Experimental procedures

All animals have been acclimated and submitted at fasted for 6 hours before supplementation. The supplementation was based on the relative dose commonly used for L-Citrulline supplementation in humans (below the maximum safe dose (Baylis; Vallance, 1998; Elango, 2023) and the maximum dose with scientifically reported results in humans (Moinard; Nicolis; Neveux; Darquy *et al.*, 2008). The dose of L-Citrulline Malate was determined to be higher than the maximum dose with results reported in scientific studies (Cunniffe; Papageorgiou; O'Brien; Davies *et al.*, 2016) so that the difference in intake of L-Citrulline was not a confounding factor in the results. Supplementation was carried out via gavage, following the guidelines of Brazil (Brasil, 2023), where: 1. Vehicle group received only ultrapure water; 2. L-Citrulline group received 170mg of L-Citrulline per kg of animal weight, diluted in ultrapure water, and 3. L-Citrulline Malate group received 260 mg of L-Citrulline Malate 2:1 (173.3 mg of L-Citrulline:86.7 mg of Malate) per kg of animal weight diluted in ultrapure water. After 90 minutes or 270 minutes, the animals were anesthetized with Isoflurane by a single dose infused in an airtight containment box (Brasil, 2023) and after the loss of reflexes was identified, the animals were exsanguinated and dissected for tissue collection.

## 2.5 Tissue collection



### 2.5.1 Blood and plasma

4 mL of blood were collected in tube containing EDTA K3 for quantification of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The tube with blood was centrifuged at 4.000 rotations per minute at 4 °C for 10 min. The plasma was extracted, stored in a cryotube, immersed in liquid nitrogen and, after freezing, transferred to an ultra-freezer and kept at -80 °C for further analysis.

### 2.5.2 Skeletal muscle

The hind paws were dissected and the *extensor digitorum longus* (EDL) and soleus muscles were removed, weighed, stored in a cryotube, immersed in liquid nitrogen and subsequently transferred to an ultra-freezer, and kept at -80 °C for analysis of nitric oxide metabolites and gene expression.

## 2.6 Tissue processing for analysis of NO metabolites

The plasma was used in its entirety after thawing at room temperature. Before used, the muscle samples were thawing at room temperature, macerated in glass macerator with PBS pH 7.4 (Feelisch; Rassaf; Mnaimneh; Singh *et al.*, 2002) and after centrifugation (4 min at 3000×g), the supernatant was used. All samples were analyzed in duplicate.

## 2.7 Measurement of nitrite concentrations

To determine their NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations, plasma or muscle supernatant aliquots has been contents analyzed using an ozone-based reductive chemiluminescence assays as previously described with NEM (10 mM) and DTPA (2 mM) (Amaral; Ferreira; Pinheiro;

Montenegro *et al.*, 2015; Feelisch; Rassaf; Mnaimneh; Singh *et al.*, 2002). 50  $\mu$ l of plasma or 250  $\mu$ l of muscle supernatant were injected into an acidified tri-iodide solution that was purged with nitrogen, in conjunction with a gas-phase chemiluminescence NO analyzer (Sievers® Model 280 NO analyzer; Boulder, CO, USA). The concentrations of nitrite in the tissues were normalized to the weight of the macerated tissue.

## 2.8 Measurement of nitrate concentrations

To determine their NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentrations, plasma or muscle supernatant aliquots has been contents analyzed by ozone-based reductive chemiluminescence assay, as previously described (Amaral; Ferreira; Pinheiro; Montenegro *et al.*, 2015; Feelisch; Rassaf; Mnaimneh; Singh *et al.*, 2002). Nitrates were measured by injecting 20  $\mu$ l of plasma or 50  $\mu$ l of supernatant into a solution of vanadium (III) in 1 N hydrochloric acid at 96 °C. A stream of nitrogen was bubbled through the purge vessel containing vanadium (III) and then into the NO analyzer (Sievers® Model 280 NO analyzer; Boulder, CO, USA), which detects the NO released for chemiluminescence detection. The concentrations of nitrate in the tissues were normalized to the weight of the macerated tissue.

## 2.9 Measurement of nitrous compounds concentrations

The RxNO<sup>-</sup> of muscle supernatant aliquots were analyzed by ozone-based reductive chemiluminescence assay method (Yang; Vivas; Reiter; Gladwin, 2003). The sample was added to a tube with sulfanilamide solution (5% in 1M hydrochloric acid) in a proportion of 10% of the final volume of the solution. After 3 minutes of reaction, 400  $\mu$ l of the sample was injected into the purge vessel in a closed system containing acidified triiodide

solution 67mM potassium iodide and 30mM iodine in glacial acetic acid) (Pinheiro; Montenegro; Amaral; Ferreira *et al.*, 2012). In another amber tube, the sample was added to a mercuric chloride solution (2%) for 2 min followed by the addition of sulfanilamide acid (5% in 1M hydrochloric acid) for 3 min, in a proportion of 10% of the volume. end of the solution. After the reaction time, 400  $\mu$ l of the sample was injected into the purge vessel as previously described. The nitrous compounds in the sample were reduced to nitric oxide, which is carried by nitrogen gas to the NO analyzer (EcoMedics® CLD 88sp). The nitric oxide formed reacts with ozone resulting in chemiluminescence at an intensity directly proportional to the formation of NO. Data acquisition as well as analyzes were carried out using the eDAQ Chart® software.

## 2.10 Gene expression quantification

After thawing, fragments of the EDL and Soleus muscles were individually homogenized for extraction of total RNA with Trizol reagent (Invitrogen®, São Paulo, Brazil), according to the manufacturer's recommendations. The amount of RNA in the samples was determined by spectrophotometry at 260 nm (A260) and 280 nm (A280), and the integrity of the isolated RNA was determined by the A260:A280 ratio, in NanoDrop UV-Vis (2000, ThermoScientific®). Next, the real-time quantitative reverse transcription technique (qPCR) was performed, with relative expression determined using primers with the SybR detection system for the target genes NOS1 (nNOS), NOS3(eNOS), HIF-1 $\alpha$  and VEGF, whose sequences are listed in Table 2, using 20 ng of complementary DNA on the ABI 7500 Fast System (Applied Biosystems®, Foster City, USA). The data were expressed as relative values determined by the comparative threshold cycle method (2-

$\Delta\Delta Ct$ ), as recommended by the manufacturer (Simino; Fontana; de Fante; Panzarin *et al.*, 2022).

## 2.11 Statistical analysis

Data were described as mean  $\pm$  standard error of the mean. The normality of the data distribution was verified by the Shapiro-Wilk test and in cases where the distribution was considered non-normal, the ROUT test (for  $Q = 1\%$ ) was used to identify true outliers, which were removed from the sample. Two-way ANOVA for mixed models was used to determine the effects of the supplement, time after ingestion, and supplement-time interaction. In case of significant differences, the Holm Sidak post-test was applied to identify the location of the difference. Statistical analysis was performed using the statistical software GraphPad Prism (GraphPad Software®, LLC, version 9.0.0 for Windows) and the significance level adopted was  $p < 0.05$ .

## 3 Results

### 3.1 Plasma nitrate and nitrite

The effects of acute supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate are shown in **Figure 5**.

Regarding plasma nitrite, there was a significant interaction between time and supplementation ( $F_{(3,20)} = 11,100$ ;  $p = 0.001$ , **Fig. 5A**). At 90 min after supplementation, plasma nitrite concentration was higher in the L-Citrulline ( $1.15 \pm 0.26$  [M]  $\mu M$ ) and L-Citrulline Malate ( $1.49 \pm 0.21$  [M]  $\mu M$ ) groups was higher than in the Control ( $0.93 \pm 0.16$

[M]  $\mu$ M) and Vehicle ( $1.14 \pm 0.16$  [M]  $\mu$ M) groups. At 270 min after supplementation, there were no significant differences between the groups (Control:  $1.06 \pm 0.21$ ; Vehicle:  $1.10 \pm 0.17$ ; L-Citrulline:  $1.02 \pm 0.20$ ; L-Citrulline Malate:  $0.95 \pm 0.16$  [M]  $\mu$ M).

There was no effect of supplementation ( $F_{(3,40)} = 2.761$ ;  $p = 0.054$ ), time ( $F_{(1,40)} = 1.914$ ;  $p = 0.174$ ), or supplementation-time interaction ( $F_{(3,40)} = 1.061$ ;  $p = 0.376$ ) for plasma nitrate (**Fig. 5B**).

### **3.2 Nitrate, Nitrite and Nitrous Compounds in Skeletal Muscle**

The effects of acute supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on NO metabolites are demonstrated in **Figure 6**.

Regarding nitrite levels in the EDL muscle (**Fig. 6A**), effects of supplementation ( $F_{(3,20)} = 4.482$ ;  $p = 0.015$ ) were observed, but not of time ( $F_{(3,20)} = 0.120$ ;  $p = 0.733$ ) or supplementation-time interaction ( $F_{(3,16)} = 8.119$ ;  $p = 0.506$ ). Regardless of the time of analysis, the nitrite concentration in the EDL muscle was higher in the L-Citrulline Malate group ( $13.00 \pm 3.98$  [M]  $\mu$ M) than in the Control ( $3.73 \pm 0.51$  [M]  $\mu$ M) and Vehicle ( $4.47 \pm 0.58$  [M]  $\mu$ M) groups, but not in relation to the L-Citrulline group ( $8.49 \pm 1.26$  [M]  $\mu$ M).

Regarding nitrite levels in the soleus muscle (**Fig. 6B**), no effects of supplementation were observed ( $F_{(3,40)} = 2.392$ ;  $p = 0.083$ ), time ( $F_{(1,40)} = 0.230$ ;  $p = 0.635$ ) or supplementation-time interaction ( $F_{(3,40)} = 1.307$ ;  $p = 0.286$ ).

Regarding nitrate concentrations in the EDL muscle (**Fig. 6C**), a supplementation-time interaction was identified ( $F_{(3,17)} = 17.260$ ;  $p < 0.001$ ). At 90 min after supplementation, nitrate concentrations in the EDL muscle were higher in the L-Citrulline ( $1.15 \pm 0.26$

[M]  $\mu$ M) and L-Citrulline Malate ( $1.49 \pm 0.21$  [M]  $\mu$ M) groups than in the Control ( $0.93 \pm 0.16$  [M]  $\mu$ M) and Vehicle ( $1.14 \pm 0.16$  [M]  $\mu$ M) groups. At 270 min after supplementation, there were no significant differences between the groups.

Regarding nitrate levels in the soleus muscle (**Fig. 6D**), no effects of supplementation were observed ( $F_{(3,40)} = 1.783$ ;  $p = 0.166$ ), time ( $F_{(1,40)} = 2.302$ ;  $p = 0.137$ ), or supplementation-time interaction ( $F_{(3,40)} = 1.331$ ;  $p = 0.278$ ).

Regarding the concentrations of nitric nitrous compound in the EDL muscle (**Fig. 6E**), there was a supplementation-time interaction ( $F_{(3,17)} = 20,440$ ;  $p < 0.001$ ). At 90 min after supplementation, there were no differences between the groups. At 270 min after ingestion, the L-Citrulline ( $1.350 \pm 0.161$  [M]  $\mu$ M) and L-Citrulline Malate ( $0.925 \pm 0.128$  [M]  $\mu$ M) groups showed higher levels of nitrous compound compared to the Control ( $0.340 \pm 0.061$  [M]  $\mu$ M) and Vehicle ( $0.262 \pm 0.034$  [M]  $\mu$ M) groups.

Regarding the concentrations of nitrous compound in the soleus muscle (**Fig. 6F**), there was an effect only of supplementation ( $F_{(3, 20)} = 3.608$ ;  $p = 0.031$ ). The L-Citrulline Malate group ( $0.012 \pm 0.032$  [M]  $\mu$ M) showed lower levels than the Vehicle group ( $0.217 \pm 0.046$  [M]  $\mu$ M), with no differences in relation to the Control ( $0.208 \pm 0.046$  [M]  $\mu$ M) or L-Citrulline ( $0.172 \pm 0.014$  [M]  $\mu$ M). There was no effect of time ( $F_{(1,20)} = 0.191$ ;  $p = 0.667$ ) and supplementation-time interaction ( $F_{(3,20)} = 0.235$ ;  $p = 0.871$ ).

### 3.3 Nitric Oxide Synthases Gene Expression in Skeletal Muscle

The effects of acute supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on the expression of genes encoding neuronal (NOS1) and endothelial (NOS3) nitric oxide synthesizing enzymes are shown in **Figure 7**.

NOS1 expression in the EDL muscle (**Fig. 7A**) showed supplementation-time interaction ( $F_{(3,12)} = 10.740$ ;  $p = 0.001$ ). At 90 min after ingestion, no differences were observed between the groups. At 270 min, NOS1 expression was increased in L-Citrulline ( $168.0 \pm 9.1$  %) and L-Citrulline Malate ( $156.0 \pm 18.6$  %) when compared with Control ( $77.0 \pm 13.9$  %) and Vehicle ( $90.2 \pm 8.0$  %).

NOS1 expression in the soleus muscle (**Fig. 7B**) also showed supplementation-time interaction ( $F_{(3,19)} = 4,295$ ;  $p = 0.018$ ). At 90 min after supplementation, NOS1 expression in soleus muscle was higher in the Vehicle group ( $154.0 \pm 17.3$  %) than in the Control ( $94.4 \pm 17.9$  %), L-Citrulline ( $70.4 \pm 7.1$  %) and L-Citrulline Malate ( $91.8 \pm 15.9$  %) groups.

NOS3 expression in the EDL muscle (**Fig. 7C**) showed no effect of supplementation ( $F_{(3,19)} = 0.318$ ;  $p = 0.812$ ), time ( $F_{(1,18)} = 2.035$ ;  $p = 0.171$ ) or supplementation-time interaction ( $F_{(3,19)} = 0.514$ ;  $p = 0.678$ ).

NOS3 expression in the soleus muscle (**Fig. 7D**) was only time-related ( $F_{(1,19)} = 11.160$ ;  $p = 0.003$ ), with values being higher at 270 min than at 90 minutes.

### **3.4 Expression of angiogenic genes in skeletal muscle**

The effects of L-Citrulline or L-Citrulline Malate supplementation on angiogenic signaling are depicted in Figure 8.

The expression of the gene encoding HIF-1 $\alpha$  in the EDL muscle (**Fig. 8A**) showed no effect of supplementation ( $F_{(3,20)} = 1.006$ ;  $p = 0.0724$ ), time ( $F_{(1,11)} = 3.948$ ;  $p = 0.04106$ ) or interaction ( $F_{(3,11)} = 0.9743$ ;  $p = 0.4397$ ).

The expression of the gene encoding HIF-1 $\alpha$  in the soleus muscle (**Fig. 8B**) showed supplementation-time interaction ( $F_{(3,37)} = 3.040$ ;  $p = 0.041$ ). At 90 min after ingestion, the expression of HIF-1 $\alpha$  L-Citrulline Malate ( $111.2 \pm 12.4$  %) compared to the Control ( $77.2 \pm 21.6$  %), Vehicle ( $93.0 \pm 13.7$  %) and L-Citrulline ( $64.3 \pm 10.3$  %) groups. At 270 min, expression was increased in L-Citrulline ( $179.0 \pm 31.3$  %) and L-Citrulline Malate ( $191.3 \pm 14.7$  %) when compared to the Control ( $97.1 \pm 22.6$  %) and Vehicle ( $86.5 \pm 9.0$  %) groups.

NOS1 expression in the EDL muscle (**Fig. 7A**) showed supplementation-time interaction ( $F_{(3,12)} = 10.740$ ;  $p = 0.001$ ). At 90 min after ingestion, no differences were observed between the groups. At 270 min, NOS1 expression was increased in L-Citrulline ( $168.0 \pm 9.1$  %) and L-Citrulline Malate ( $156.0 \pm 18.6$  %) when compared with Control ( $77.0 \pm 13.9$  %) and Vehicle ( $90.2 \pm 8.0$  %).

The expression of the gene encoding VEGF in the EDL muscle (**Fig. 8C**) showed no effect of supplementation ( $F_{(3,19)} = 0.821$ ;  $p = 0.498$ ), time ( $F_{(1,17)} = 1.891$ ;  $p = 0.187$ ) or interaction ( $F_{(3,17)} = 1.080$ ;  $p = 0.384$ ).

The expression of the gene encoding VEGF in the soleus muscle (**Fig. 8D**) showed no effect of supplementation ( $F_{(3,32)} = 0.737$ ;  $p = 0.538$ ), time ( $F_{(1,32)} = 3.739$ ;  $p = 0.062$ ) or interaction ( $F_{(3,32)} = 0.908$ ;  $p = 0.448$ ).



#### 4 Discussion

Here, we evaluated plasma and muscle nitric oxide metabolism, the expression of genes encoding NOS, and angiogenic genes in skeletal muscles of adult rats, with different predominant muscle fiber compositions (EDL and soleus) in response to acute oral supplementation of L-Citrulline and L-Citrulline Malate. Our results demonstrated that direct NO metabolites (nitrite, nitrate, and nitrous compounds) and that NOS gene expression are increased by L-Citrulline and L-Citrulline Malate supplementation, but only in EDL muscle, not soleus. We also demonstrated that L-Citrulline Malate is more efficient in activating NO metabolism than L-Citrulline alone. Regarding the activation of angiogenic gene expression, only the soleus muscle was responsive to supplementation, with increased expression of HIF-1 $\alpha$ . L-Citrulline Malate is able to activate HIF-1 $\alpha$  earlier than L-Citrulline alone. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate NO metabolites and expression of NOS and angiogenic genes in skeletal muscle in response to oral ingestion of L-citrulline or L-citrulline Malate.

The increase in NO metabolites in blood plasma after ingestion of L-Citrulline, observed in our results, is corroborated by animal studies (Berthe; Darquy; Breuillard; Lamoudi *et al.*, 2011) and also in humans (Schwedhelm, Edzard; Maas, Renke; Freese, Ralf; Jung, Donald *et al.*, 2008). Orally ingested L-Citrulline is converted into L-Arginine in the kidneys, promoting an increase of this amino acid in the plasma between 60 and 90 minutes after ingestion. The consequent increase in plasma L-Arginine is accompanied by an increase in NO production (Kim; Schutzler; Schrader; Spencer *et al.*, 2015),

which is rapidly oxidized to nitrite and then to nitrate., Hou et al. demonstrated that the ingestion of malate, isolated, to spontaneously hypertensive animals with low endogenous levels of L-Arginine and NO, was also able to increase NO levels (Hou; Sun; Zhang; Zhao *et al.*, 2017). This study proposed that the mechanism responsible for the increase in NO was related to the conversion of Malate-Oxaloacetate-Aspartate-L-Citrulline-L-Arginine-NO, however, the addition of Malate to L-Citrulline did not potentiate the increase observed with L-Citrulline alone in our study. It is possible that the addition of L-Citrulline provided enough L-Arginine to reach maximum saturation or enzymatic rate. Acute dose-response studies with L-Citrulline and L-Citrulline Malate have not yet been conducted.

In our study, only nitrite was increased at 90 minutes after ingestion. The metabolism of NO in the blood occurs rapidly, with nitrite as the direct product of NO oxidation in plasma, followed by nitrate oxidation, as a more stable form (Baylis; Vallance, 1998). At 270 minutes, nitrite values were normalized, which is in accordance with the half-life demonstrated for plasma nitrite from other precursors (Ferreira; Pinheiro; Oliveira-Paula; Angelis *et al.*, 2021; Pinheiro; Ferreira; Vilalva; Toledo *et al.*, 2018) and L-Citrulline (Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Kashfi, K.; Ghasemi, A., 2021) Here, we demonstrated that plasma nitrate did not show significant differences, as expected. However, the values showed a tendency towards a treatment-related effect ( $p = 0.055$ ) with L-Citrulline Malate. Previously published studies with the ingestion of L-Citrulline have shown an increase in nitrate production (Berthe; Darquy; Breuillard; Lamoudi *et al.*, 2011; Schwedhelm, E.; Maas, R.; Freese, R.; Jung, D. *et al.*, 2008) measured in urine, after supplementation (not plasma), with daily use for at least one week. The differences in the duration of

supplementation may explain the difference in the results, since our product was of acute ingestion.

In skeletal muscle, increased NO metabolism was observed, with an increase in the concentrations of nitrite, nitrate and nitrous compounds, but only in EDL muscle. The morphological characteristic of EDL is the predominance of type II fibers (~90%) (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990) while in soleus, the composition is predominantly of type I fibers (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Wigston; English, 1992) It has been previously shown that the content of NOS1 in skeletal muscle with more Type II fibers is much higher than that of NOS3 (Kobzik; Reid; Bredt; Stamler, 1994; Stamler; Meissner, 2001) and that its activity to generate NO can be up to 6 times greater than that of NOS3, under conditions of adequate substrate supply (Adak; Aulak; Stuehr, 2001)

Type I muscle fibers are recruited under conditions of rapid increase in metabolic demand, with low oxygen concentrations (Jones; Ferguson; Bailey; Vanhatalo *et al.*, 2016) and predominant glycolytic metabolism (Ramsey; Bakker; Pinniger, 2010; Ranatunga; Thomas, 1990) as occurs in intense exercise. Thus, it can be expected that muscles with low oxygenation have a more efficient machinery for metabolizing NO to more stable compounds, such as nitrate, which can be activated under conditions of reduced partial pressure of oxygen in the tissue and the need for immediate microvascular adjustments (Jones; Ferguson; Bailey; Vanhatalo *et al.*, 2016). This could explain, at least in part, the differences we observed in the concentrations of NO metabolites between EDL and soleus.

The results showed that supplementation with L-Citrulline Malate is more efficient in increasing nitrite levels in EDL than L-Citrulline alone. The metabolization of L-Arginine to NO is promoted with the use of NADPH and FAD by NOS (Wu; Morris, 1998) with NADPH as a limiting factor for the first step of enzymatic activity (Gantner; LaFond; Bonini, 2020) In pancreatic cells (Munhoz; Riva; de Jesus; Curi *et al.*, 2016), hepatic (McHugh; Drake, 1989) and adipose (**McHugh; Drake, 1989**) Malate Dehydrogenase is able to convert Malate to Pyruvate and activate anabolic pathways (Simmen; Alhallak; Simmen, 2020) under favorable energy conditions.

An isoenzyme of Malate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase 1, has been identified in the cytosol of muscle cells (Taroni; Di Donato, 1988). Although not experimentally demonstrated in type I muscle cells, it is possible to suppose that, under resting conditions and insulin at basal levels, with predominance of glycolytic metabolism, poorly developed oxidative machinery and low mitochondrial content, supplemented malate has been diverted to the production of glycolytic energy via pyruvate production. On the other hand, the levels of NADPH generated could be used by the sarcoplasmic nNOS as a cofactor of the reductase domain, and potentiate the production of NO (Wu; Morris, 1998), however, further studies are needed to confirm or refute this mechanism.

Skeletal muscle has been configured as a nitrate stock, which can be accessed, when necessary, to generate NO through non-canonical pathways (Piknova; Park; Kwan Jeff Lam; Schechter, 2016) Therefore, we expected that nitrate levels would remain elevated in the EDL even at 270 min after ingestion, however, this effect was not observed. Studies with nitrate intake (Park; Thomas; Schechter; Piknova, 2021) demonstrated results that differed from ours, with high concentrations of both nitrite and nitrate, either in

muscles with a predominance of Type II fibers or with a predominance of Type I. Park and Piknova's studies used nitrate-enriched water intake for 5 days, although both Nitrate and L-Citrulline promote the generation of NO, the related mechanisms are different, since the L-Citrulline pathway is dependent on NOS, and Nitrate involves NOS, but also nitrate reductases, xanthine oxidases, sialine and myoglobin, in addition to the metabolism of commensal bacteria from the oral tract (for review, see (Kapil; Khambata; Jones; Rathod *et al.*, 2020; Piknova; Schechter; Park; Vanhatalo *et al.*, 2022; van Faassen; Bahrami; Feelisch; Hogg *et al.*, 2009). The specific characteristics of the NO precursor associated with the time used in the supplementation protocol may explain the different results between the studies.

The absence of significant effects on soleus muscle may stem from its metabolic profile. Nitrate levels are commonly higher in muscles with a predominance of Type I fibers, when compared to those predominantly composed of Type II (Park; Thomas; Schechter; Piknova, 2021). Can assume that the levels of nitrate stored were already adequate, and it was not necessary to significantly increase its production for storage. In addition, muscles with a predominance of Type I fibers are widely vascularized, in addition to having partial oxygen pressure and a normally higher number of erythrocytes. It is expected that the reserves already present would meet the immediate needs of NO, when necessary, while new intakes could be provided via NOS3, activated by other mechanisms, such as increased calcium influx (Kuchan; Frangos, 1994) glucose and insulin levels (Tsukahara; Gordienko; Tonshoff; Gelato *et al.*, 1994) and by the shear forces promoted by the increase in blood flow (Michel, 1998) as occurs during physical exercise.

In EDL, NOS1 gene expression was upregulated by increased levels of L-Arginine in response to L-Citrulline or L-Citrulline Malate. On the other hand, in the soleus, only L-Citrulline Malate promoted an increase in the expression of NOS3. The increase in NOS1 in response to higher substrate concentrations was expected (DeMartino; Kim-Shapiro; Patel; Gladwin, 2019) Since higher levels of NO were not observed in soleus muscle, the results point to effects related to Malate alone. The addition of malate also induced an increase in HIF-1 $\alpha$  levels, but this increase was observed earlier than that identified in relation to NOS3. A mapping of the control of NOS3 expression in endothelial cells had already identified regions containing binding elements for HIF-1 $\alpha$  (Coulet; Nadaud; Agrapart; Soubrier, 2003). thus, the increased levels observed in the soleus muscle may be a response to the high expression of HIF-1 $\alpha$ .

Although HIF-1 $\alpha$  is the key regulator for VEGF expression (Levett; Viganò; Capitanio; Vasso *et al.*, 2015), even in soleus, VEGF expression was not increased. The time course for VEGF gene expression in skeletal muscle depends on the type and intensity of the stimulus. In humans, it occurs between 2 and 4 hours in response to exercise (Gavin; Robinson; Yeager; England *et al.*, 2004) , and appears more responsive to mechanical stress (Brown; Hudlicka, 2003), as it occurs during muscle contraction. At rest, it is possible that VEGF activation via HIF-1 $\alpha$  is slower. In animals and humans, the VEGF response in skeletal muscle is reduced in aging (Gavin; Robinson; Yeager; England *et al.*, 2004). It is possible that some effect of age affected the results, however, the comparison with younger animals was not performed in this study.

Our results indicate that in muscles with a predominance of Type II fibers, the consumption of L-Citrulline Malate induced potential responses only on the metabolism of

nitric oxide - angiogenic pathways did not benefit more from the addition of Malate compared to the consumption of L-Citrulline alone, whereas in muscles with a predominance of Type I fibers, the addition of Malate to L-Citrulline favored the angiogenic pathways earlier. The expression of NOS3 was favored by the consumption of L-Citrulline Malate only, which points to an unclear signaling between the levels of intermediates of the Tricarboxylic Acid Cycle and the specific regulation of NOS3.

## 5 Conclusion

The present study demonstrated that acute supplementation with L-Citrulline Malate potentiates the increase in nitric oxide metabolism caused by isolated L-Citrulline and activates angiogenesis pathways in the skeletal muscle of adult rats, which confirms our initial hypothesis. However, the differential effects are dependent on the predominance of the fibers that make up the muscle evaluated.

Apparently, predominantly glycolytic muscles (Type II) benefit from acute L-Citrulline Malate supplementation through the enhancement of improvements in nitric oxide metabolism, already promoted by L-Citrulline. In predominantly oxidative muscles (Type I), nitric oxide metabolism is not immediately benefited, however, angiogenic signaling pathways are favored. A graphic abstract is shown in **Figure 6**, which presents an overview of the differential effects produced by the ingestion of L-Citrulline Malate and the possible related mechanisms of action.

Enzyme activity per se, effects of long-term supplementation, synergy with physical exercise and benefits on younger organisms are gaps that the limitations of the present study cannot fill, but which open avenues for future research.

The results presented here can contribute to the understanding of the mechanisms through which L-Citrulline Malate can promote skeletal muscle health or performance. Strategies that support active aging, to reduce the impacts of disorders related to muscular functioning and better performance in the face of exercise using nutritional compounds are relevant targets for the science of nutrition in health and physical activity.

## **Acknowledgements**

Would like to thank Vinícius, Danilo and Maria Clara for their support in animal care and laboratory maintenance.

APFAM and AEELS designed research; APFAM, JVBS, MCS, WJS, SBS, LAPS and SOCT conducted research; APFAM, LAPS and SOCT analyzed data; APFAM, AEELS, TMQ, AST, JETS and CVGL provided essential reagents and essential materials; APFAM and AEELS wrote the paper; APFM and AEELS had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

## **Data Availability**

Data described in the manuscript will be made available upon request.

## **Funding**

**CAPES and .....**

## **Author Disclosures**



The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise. Results of the present study are presented clearly, honestly and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation.

## References

- 566 ABU-SOUD, H. M.; ROUSSEAU, D. L.; STUEHR, D. J. Nitric oxide binding to the heme  
567 of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. J. Biol.  
568 Chem., v. 271, n. 51, p. 32515-32518, 20 dez. 1996.
- 569 ADAK, S.; AULAK, K. S.; STUEHR, D. J. Chimeras of nitric-oxide synthase types I and  
570 III establish fundamental correlates between heme reduction, heme-NO complex for-  
571 mation, and catalytic activity. J. Biol. Chem., v. 276, n. 26, p. 23246-23252, 29 jun. 2001.
- 572 ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure,  
573 function and inhibition. Biochem. J., v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, 1 ago. 2001.
- 574 AMARAL, Jefferson; FERREIRA, Grazielle; PINHEIRO, Lucas; MONTENEGRO, Marcelo  
575 et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-  
576 salt hypertension. Redox Biology, v. 5, 31 ago. 2015.
- 577 ANDERSEN, P.; ADAMS, R. P.; SJØGAARD, G.; THORBOE, A. et al. Dynamic knee  
578 extension as model for study of isolated exercising muscle in humans. J. Appl. Physiol.  
579 (1985), v. 59, n. 5, p. 1647-1653, nov. 1985.
- 580 ANDERSEN, P.; HENRIKSSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of  
581 man: adaptive response to exercise. J. Physiol., v. 270, n. 3, p. 677-690, set. 1977.
- 582 ANDERSEN, P.; SALTIN, B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. J. Physiol., v.  
583 366, p. 233-249, set. 1985.
- 584 ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanyl-  
585 ate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue  
586 preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 74, n. 8, p. 3203-3207, ago. 1977.
- 587 BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; GHASEMI, A.; KABIR, A. et al. Is dietary nitrate/nitrite  
588 exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and  
589 meta-analysis. Nitric Oxide, v. 47, p. 65-76, 1 maio 2015.

- 590 BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; KASHFI, K.; GHASEMI, A. Endogenous flux of nitric  
591 oxide: Citrulline is preferred to Arginine. *Acta Physiol. (Oxf.)*, v. 231, n. 3, p. e13572, mar.  
592 2021.
- 593 BAHRI, S.; ZERROUK, N.; AUSSEL, C.; MOINARD, C. et al. Citrulline: from metabolism  
594 to therapeutic use. *Nutrition*, v. 29, n. 3, p. 479-484, mar. 2013.
- 595 BARCROFT, H. An enquiry into the nature of the mediator of the vasodilatation in skeletal  
596 muscle in exercise and during circulatory arrest. *J. Physiol.*, v. 222, n. 2, p. 99p-118p, abr.  
597 1972.
- 598 BAUM, O.; DA SILVA-AZEVEDO, L.; WILLERDING, G.; WÖCKEL, A. et al. Endothelial  
599 NOS is main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after  
600 prazosin administration. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 287, n. 5, p. H2300-2308,  
601 nov. 2004.
- 602 BAUM, O.; HUBER-ABEL, F. A. M.; FLÜCK, M. nNOS increases fiber type-specific angi-  
603 ogenesis in skeletal muscle of mice in response to endurance exercise. *International*  
604 *Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 11, 26 maio 2023.
- 605 BAUM, O.; VIEREGGE, M.; KOCH, P.; GÜL, S. et al. Phenotype of capillaries in skeletal  
606 muscle of nNOS-knockout mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative*  
607 *and Comparative Physiology*, v. 304, n. 12, p. R1175-R1182, 15 jun. 2013.
- 608 BAYLIS, C.; VALLANCE, P. Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine-  
609 -what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system?  
610 *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 7, n. 1, p. 59-62, jan. 1998.
- 611 BENDAHAN, D.; MATTEI, J. P.; GHATTAS, B.; CONFORT-GOUNY, S. et al. Citrul-  
612 line/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *British Jour-*  
613 *nal of Sports Medicine*, v. 36, n. 4, p. 282-289, 2002.
- 614 BERCHNER-PFANNSCHMIDT, U.; TUG, S.; KIRSCH, M.; FANDREY, J. Oxygen-sens-  
615 ing under the influence of nitric oxide. *Cellular Signalling*, v. 22, n. 3, p. 349-356, mar.  
616 2010.
- 617 BERTHE, Marie-Clotilde; DARQUY, Sylviane; BREUILLARD, Charlotte; LAMOUDI,  
618 Lynda et al. High plasma citrulline and arginine levels ensured by sustained-release cit-  
619 rulline supplementation in rats. *Nutrition*, v. 27, n. 11, p. 1168-1171, nov. 2011.
- 620 BESCÓS, R.; SUREDA, A.; TUR, J. A.; PONS, A. The effect of nitric-oxide-related sup-  
621 plements on human performance. *Sports Medicine*, v. 42, n. 2, p. 99-117, 1 fev. 2012.

- 622 BEVEGÅRD, S.; ORÖ, L. Effect of prostaglandin E1 on forearm blood flow. *Scandinavian*  
623 *Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 23, n. 4, p. 347-353, jun. 1969.
- 624 BLOOMER, R. J.; WILLIAMS, S. A.; CANALE, R. E.; FARNEY, T. M. et al. Acute effect  
625 of nitric oxide supplement on blood nitrate/nitrite and hemodynamic variables in re-  
626 sistance trained men. *Journal of Strength and Conditioning Research*, v. 24, n. 10, p.  
627 2587-2592, out. 2010.
- 628 BLOTTNER, D.; LÜCK, G. Nitric oxide synthase (NOS) in mouse skeletal muscle devel-  
629 opment and differentiated myoblasts. *Cell and Tissue Research*, v. 292, n. 2, p. 293-302,  
630 maio 1998.
- 631 BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *Alternative Therapies in Health and*  
632 *Medicine*, v. 20, n. 3, p. 48-54, maio/jun. 2014.
- 633 BONDONNO, C. P.; CROFT, K. D.; HODGSON, J. M. Dietary nitrate, nitric oxide, and  
634 cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 12, p.  
635 2036-2052, 9 set. 2016.
- 636 BRADLEY, Scott J.; KINGWELL, Bronwyn A.; CANNY, Benedict J.; MCCONELL, Glenn  
637 K. Skeletal muscle neuronal nitric oxide synthase  $\mu$  protein is reduced in people with im-  
638 paired glucose homeostasis and is not normalized by exercise training. *Metabolism*, v.  
639 56, n. 10, p. 1405-1411, out. 2007.
- 640 BRASIL. *Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em ativida-*  
641 *des de ensino ou pesquisa científica*. 1. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e  
642 Inovação, 2023. 1017 p. ISBN 978-65-5471-037-4.
- 643 BROWN, M. D.; HUDLICKA, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal mus-  
644 cle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis*,  
645 v. 6, n. 1, p. 1-14, 2003.
- 646 CALARESU, F. R.; FAIERS, A. A.; MOGENSEN, G. J. Central neural regulation of heart  
647 and blood vessels in mammals. *Progress in Neurobiology*, v. 5, n. 1, p. 1-35, 1975.
- 648 CAPITANIO, D.; FANIA, C.; TORRETTA, E.; VIGANÒ, A. et al. TCA cycle rewiring fosters  
649 metabolic adaptation to oxygen restriction in skeletal muscle from rodents and humans.  
650 *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 9723, 29 ago. 2017.
- 651 CASEY, D. P.; RANADIVE, S. M.; JOYNER, M. J. Aging is associated with altered vaso-  
652 dilator kinetics in dynamically contracting muscle: role of nitric oxide. *Journal of Applied*  
653 *Physiology* (1985), v. 119, n. 3, p. 232-241, 1 ago. 2015.

- 654 CHURCHWARD-VENNE, T. A.; COTIE, L. M.; MACDONALD, M. J.; MITCHELL, C. J. et  
655 al. Citrulline does not enhance blood flow, microvascular circulation, or myofibrillar protein  
656 synthesis in elderly men at rest or following exercise. *American Journal of Physiology -*  
657 *Endocrinology and Metabolism*, v. 307, n. 1, p. E71-E83, 1 jul. 2014.
- 658 CLIFFORD, P. S.; HELLSTEN, Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal mus-  
659 cle. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 97, n. 1, p. 393-403, jul. 2004.
- 660 COBLEY, J. N.; SAKELLARIOU, G. K.; OWENS, D. J.; MURRAY, S. et al. Lifelong train-  
661 ing preserves some redox-regulated adaptive responses after an acute exercise stimulus  
662 in aged human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 70, p. 23-32, maio  
663 2014.
- 664 COMAS, Christiane Congro. Zoneamento agrícola de risco climático da melancia é am-  
665 pliado para todas as regiões do Brasil. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/59181710/zoneamento-agricola-de-risco-climatico-da-melancia-e-ampliado-para-todas-as-regioes-do-brasil#:~:text=In-forma%C3%A7%C3%B5es%20da%20AgroStat%20Brasil%2C%20do%20Minist%C3%A9rio%20da%20Agricultura%2C,representando%204%2C5%25%20das%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20de%20frutas%20do%20Brasil>. Acesso em: 27 nov. 2021.
- 672 CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S. et al. Bipha-  
673 sic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of  
674 nitric oxide. *Journal of Immunology*, v. 166, n. 6, p. 3873-3881, 15 mar. 2001.
- 675 CORCONDILAS, A.; KOROXENIDIS, G. T.; SHEPHERD, J. T. Effect of a brief contrac-  
676 tion of forearm muscles on forearm blood flow. *Journal of Applied Physiology*, v. 19, p.  
677 142-146, jan. 1964.
- 678 COULET, F.; NADAUD, S.; AGRAPART, M.; SOUBRIER, F. Identification of hypoxia-  
679 response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *Journal*  
680 *of Biological Chemistry*, v. 278, n. 47, p. 46230-46240, 21 nov. 2003.
- 681 CUNNIFFE, Brian; PAPAGEORGIOU, Maria; O'BRIEN, Barbara; DAVIES, Nathan A. et  
682 al. Acute citrulline-malate supplementation and high-intensity cycling performance. *Jour-*  
683 *nal of Strength and Conditioning Research*, v. 30, n. 9, p. 2638-2647, 2016.
- 684 CUTRUFELLO, P. T.; GADOMSKI, S. J.; ZAVORSKY, G. S. The effect of L-citrulline and  
685 watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. *Jour-*  
686 *nal of Sports Sciences*, v. 33, n. 14, p. 1459-1466, 2015.

- 687 DAIBER, A.; MÜNZEL, T. Organic nitrate therapy, nitrate tolerance, and nitrate-induced  
688 endothelial dysfunction: emphasis on redox biology and oxidative stress. *Antioxidants &*  
689 *Redox Signaling*, v. 23, n. 11, p. 899-942, 10 out. 2015.
- 690 DEMARTINO, Anthony W.; KIM-SHAPIRO, Daniel B.; PATEL, Rakesh P.; GLADWIN,  
691 Mark T. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *British Journal of Pharmacol-*  
692 *ogy*, v. 176, n. 2, p. 228-245, 2019.
- 693 DOWLING, P.; GARGAN, S.; SWANDULLA, D.; OHLENDIECK, K. Fiber-type shifting in  
694 sarcopenia of old age: proteomic profiling of the contractile apparatus of skeletal muscles.  
695 *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 3, 26 jan. 2023.
- 696 EELEN, Guy; DE ZEEUW, Pauline; TREPS, Lucas; HARJES, Ulrike et al. Endothelial cell  
697 metabolism. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 3-58, 2018.
- 698 EICH, R. F.; LI, T.; LEMON, D. D.; DOHERTY, D. H. et al. Mechanism of NO-induced  
699 oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry*, v. 35, n. 22, p. 6976-6983, 4 jun.  
700 1996.
- 701 ELANGO, Rajavel. Tolerable upper intake level for individual amino acids in humans: a  
702 narrative review of recent clinical studies. *Advances in Nutrition*, v. 14, n. 4, p. 885-894,  
703 1 jul. 2023.
- 704 FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N. et al. Concomitant S-, N-, and  
705 heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo.  
706 *FASEB Journal*, v. 16, n. 13, p. 1775-1785, nov. 2002.
- 707 FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: orchestrator of endothe-  
708 lium-dependent responses. *Annals of Medicine*, v. 44, n. 7, p. 694-716, nov. 2012.
- 709 FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; ANGELIS, C. D. et al.  
710 Antioxidant tempol modulates the increases in tissue nitric oxide metabolites concentra-  
711 tions after oral nitrite administration. *Chemico-Biological Interactions*, v. 349, p. 109658,  
712 1 nov. 2021.
- 713 FILIPPIN, L. I.; CUEVAS, M. J.; LIMA, E.; MARRONI, N. P. et al. Nitric oxide regulates  
714 the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*, v. 24, n. 1, p. 43-49, 1 jan. 2011.
- 715 FRANDSEN, U.; BANGSBO, J.; LANGBERG, H.; SALTIN, B. et al. Inhibition of nitric ox-  
716 ide synthesis by systemic N(G)-monomethyl-L-arginine administration in humans: effects  
717 on interstitial adenosine, prostacyclin and potassium concentrations in resting and con-  
718 tracting skeletal muscle. *Journal of Vascular Research*, v. 37, n. 4, p. 297-302, jul./ago.  
719 2000.

- 720 FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Cir-*  
721 *culation Research*, v. 53, n. 5, p. 557-573, nov. 1983.
- 722 FURCHGOTT, R. F. Nitric oxide: from basic research on isolated blood vessels to clinical  
723 relevance in diabetes. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina*, v. 115, n. 2, p.  
724 317-331, 1998.
- 725 FURCHGOTT, R. F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and  
726 identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, v. 19, n. 4, p. 235-251, ago. 1999.
- 727 FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the re-  
728 laxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373-376,  
729 27 nov. 1980.
- 730 GAMBARDELLA, Jessica; FIORDELISI, Antonella; SPIGNO, Luca; BOLDRINI, Lorenzo  
731 et al. Effects of chronic supplementation of L-arginine on physical fitness in water polo  
732 players. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, p. 6684568-6684568, 2021.
- 733 GANTNER, B. N.; LAFOND, K. M.; BONINI, M. G. Nitric oxide in cellular adaptation and  
734 disease. *Redox Biology*, v. 34, p. 101550, jul. 2020.
- 735 GARTEN, R. S.; GROOT, H. J.; ROSSMAN, M. J.; GIFFORD, J. R. et al. The role of  
736 muscle mass in exercise-induced hyperemia. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v.  
737 116, n. 9, p. 1204-1209, 1 maio 2014.
- 738 GARVEY, C.; TIEP, B.; CARTER, R.; BARNETT, M. et al. Severe exercise-induced hy-  
739 poxemia. *Respiratory Care*, v. 57, n. 7, p. 1154-1160, jul. 2012.
- 740 GAVIN, T. P.; ROBINSON, C. B.; YEAGER, R. C.; ENGLAND, J. A. et al. Angiogenic  
741 growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. *Journal of*  
742 *Applied Physiology (1985)*, v. 96, n. 1, p. 19-24, jan. 2004.
- 743 GILLIARD, C. N.; LAM, J. K.; CASSEL, K. S.; PARK, J. W. et al. Effect of dietary nitrate  
744 levels on nitrate fluxes in rat skeletal muscle and liver. *Nitric Oxide*, v. 75, p. 1-7, 1 maio  
745 2018.
- 746 GILLS, J. L.; GLENN, J. M.; GRAY, M.; ROMER, B. et al. Acute citrulline-malate supple-  
747 mentation is ineffective during aerobic cycling and subsequent anaerobic performance in  
748 recreationally active males. *European Journal of Sport Science*, v. 21, n. 1, p. 77-83, jan.  
749 2021.
- 750 GOLUB, Aleksander S.; PITTMAN, Roland N. Bang-bang model for regulation of local  
751 blood flow. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, v. 20, n. 6, p. 455-483, 2013.

- 752 GONZÁLEZ-DOMENECH, C. M.; MUÑOZ-CHÁPULI, R. Molecular evolution of nitric ox-  
753 ide synthases in metazoans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Ge-*  
754 *nomics and Proteomics*, v. 5, n. 4, p. 295-301, dez. 2010.
- 755 GONZALEZ, A. M.; TOWNSEND, J. R.; PINZONE, A. G.; HOFFMAN, J. R. Supplemen-  
756 tation with nitric oxide precursors for strength performance: a review of the current litera-  
757 ture. *Nutrients*, v. 15, n. 3, 28 jan. 2023.
- 758 GRIMBLE, G. K. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids.  
759 *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 6 Suppl 2, p. 1693S-1701S, jun. 2007.
- 760 GUEUGNEAU, M.; COUDY-GANDILHON, C.; MEUNIER, B.; COMBARET, L. et al.  
761 Lower skeletal muscle capillarization in hypertensive elderly men. *Experimental Geron-*  
762 *tology*, v. 76, p. 80-88, abr. 2016.
- 763 HABERMEYER, M.; ROTH, A.; GUTH, S.; DIEL, P. et al. Nitrate and nitrite in the diet:  
764 how to assess their benefit and risk for human health. *Molecular Nutrition & Food Re-*  
765 *search*, v. 59, n. 1, p. 106-128, jan. 2015.
- 766 HALL, C. N.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo?  
767 *Nitric Oxide*, v. 21, n. 2, p. 92-103, set. 2009.
- 768 HENDRICKSE, P.; DEGENS, H. The role of the microcirculation in muscle function and  
769 plasticity. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 40, n. 2, p. 127-140, jun. 2019.
- 770 HICKNER, R. C.; KEMENY, G.; MCIVER, K.; HARRISON, K. et al. Lower skeletal muscle  
771 nutritive blood flow in older women is related to eNOS protein content. *Journals of Ger-*  
772 *ontology: Series A*, v. 58, n. 1, p. 20-25, jan. 2003.
- 773 HICKNER, R. C.; KEMENY, G.; STALLINGS, H. W.; MANNING, S. M. et al. Relationship  
774 between body composition and skeletal muscle eNOS. *International Journal of Obesity*  
775 *(London)*, v. 30, n. 2, p. 308-312, fev. 2006.
- 776 HORD, J. M.; BOTCHLETT, R.; LAWLER, J. M. Age-related alterations in the sarcolem-  
777 mal environment are attenuated by lifelong caloric restriction and voluntary exercise. *Ex-*  
778 *perimental Gerontology*, v. 83, p. 148-157, out. 2016.
- 779 HORD, N. G. Dietary nitrates, nitrites, and cardiovascular disease. *Current Atherosclero-*  
780 *sis Reports*, v. 13, n. 6, p. 484-492, dez. 2011.
- 781 HOU, E.; SUN, N.; ZHANG, F.; ZHAO, C. et al. Malate and aspartate increase L-arginine  
782 and nitric oxide and attenuate hypertension. *Cell Reports*, v. 19, n. 8, p. 1631-1639, 23  
783 maio 2017.

- 784 HUDLICKA, O. Microcirculation in skeletal muscle. *Muscles, Ligaments and Tendons*  
785 *Journal*, v. 1, n. 1, p. 3-11, jan. 2011.
- 786 HUERTA OJEDA, Á.; DOMÍNGUEZ DE HANNA, A.; BARAHONA-FUENTES, G. [The  
787 effect of supplementation with L-arginine and L-citrulline on physical performance: a sys-  
788 tematic review]. *Nutrición Hospitalaria*, v. 36, n. 6, p. 1389-1402, 26 dez. 2019.
- 789 IGNARRO, L. J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide  
790 formed and released from artery and vein. *Circulation Research*, v. 65, n. 1, p. 1-21, jul.  
791 1989.
- 792 ISSENBERG, P. Nitrite, nitrosamines, and cancer. *Federation Proceedings*, v. 35, n. 6,  
793 p. 1322-1326, 1 maio 1976.
- 794 JACKSON, W. F. Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor and what is the mech-  
795 anism of action? *Journal of Physiology*, v. 594, n. 18, p. 5055-5077, 15 set. 2016.
- 796 JONES, A. M.; VANHATALO, A.; SEALS, D. R.; ROSSMAN, M. J. et al. Dietary nitrate  
797 and nitric oxide metabolism: mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise perfor-  
798 mance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 27 jul. 2020.
- 799 JONES, A. M.; VANHATALO, A.; SEALS, D. R.; ROSSMAN, M. J. et al. Dietary nitrate  
800 and nitric oxide metabolism: mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise perfor-  
801 mance. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 53, n. 2, p. 280-294, 1 fev. 2021.
- 802 JONES, Andrew M.; FERGUSON, Scott K.; BAILEY, Stephen J.; VANHATALO, Anni et  
803 al. Fiber type-specific effects of dietary nitrate. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v.  
804 44, n. 2, p. 53-60, 2016.
- 805 JOYNER, Michael J.; CASEY, Darren P. Regulation of increased blood flow (hyperemia)  
806 to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiological*  
807 *Reviews*, v. 95, n. 2, p. 549-601, 2015.
- 808 KALLIOKOSKI, K. K.; LANGBERG, H.; RYBERG, A. K.; SCHEEDE-BERGDAHL, C. et  
809 al. Nitric oxide and prostaglandins influence local skeletal muscle blood flow during exer-  
810 cise in humans: coupling between local substrate uptake and blood flow. *American Jour-*  
811 *nal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 291, n. 3, p.  
812 R803-R809, set. 2006.
- 813 KAPIL, V.; KHAMBATA, R. S.; JONES, D. A.; RATHOD, K. et al. The noncanonical path-  
814 way for in vivo nitric oxide generation: the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Pharmaco-*  
815 *logical Reviews*, v. 72, n. 3, p. 692-766, jul. 2020.



- 816 KIM, I. Y.; SCHÜTZLER, S. E.; SCHRADER, A.; SPENCER, H. J. et al. Acute ingestion  
817 of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy  
818 young and older adults with heart failure. *American Journal of Physiology-Endocrinology*  
819 *and Metabolism*, v. 309, n. 11, p. E915-E924, 1 dez. 2015.
- 820 KISSNER, R.; NAUSER, T.; BUGNON, P.; LYE, P. G. et al. Formation and properties of  
821 peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique,  
822 and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology*, v. 10, n. 11, p. 1285-1292, nov.  
823 1997.
- 824 KIYICI, F.; EROĞLU, H.; KISHALI, N. F.; BURMAOĞLU, G. The effect of Citrulline/Malate  
825 on blood lactate levels in intensive exercise. *Biochemical Genetics*, v. 55, n. 5-6, p. 387-  
826 394, dez. 2017.
- 827 KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDET, D. S.; STAMLER, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle.  
828 *Nature*, v. 372, n. 6506, p. 546-548, 8 dez. 1994.
- 829 KRAMER, K.; OBAL, F.; QUENSEL, W. Untersuchungen über den Muskelstoffwechsel  
830 des Warmblüters. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der*  
831 *Tiere*, v. 241, n. 5, p. 717-729, abr. 1939.
- 832 KRUMENACKER, J. S.; HANAFY, K. A.; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and solu-  
833 ble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin*, v. 62, n. 6, p. 505-515, 15 fev. 2004.
- 834 KUCHAN, M. J.; FRANGOS, J. A. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric  
835 oxide production in endothelial cells. *American Journal of Physiology*, v. 266, n. 3 Pt 1, p.  
836 C628-636, mar. 1994.
- 837 KUMAR, P.; LIU, C.; HSU, J. W.; CHACKO, S. et al. Glycine and N-acetylcysteine  
838 (GlyNAC) supplementation in older adults improves glutathione deficiency, oxidative  
839 stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, insulin resistance, endothelial dysfunc-  
840 tion, genotoxicity, muscle strength, and cognition: Results of a pilot clinical trial. *Clinical*  
841 *Translational Medicine*, v. 11, n. 3, p. e372, mar. 2021.
- 842 KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the  
843 vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, n. 3, p. 556-  
844 592, 2012.
- 845 LANCASTER, J. R., Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric*  
846 *Oxide*, v. 1, n. 1, p. 18-30, fev. 1997.
- 847 LAUGHLIN, M. H.; ARMSTRONG, R. B. Muscle blood flow during locomotory exercise.  
848 *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 13, p. 95-136, 1985.

- 849 LEUNG, E.; CAIRNS, R. A.; CHAUDARY, N.; VELLANKI, R. N. et al. Metabolic targeting  
850 of HIF-dependent glycolysis reduces lactate, increases oxygen consumption and en-  
851 hances response to high-dose single-fraction radiotherapy in hypoxic solid tumors. *BMC*  
852 *Cancer*, v. 17, n. 1, p. 418, 15 jun. 2017.
- 853 LEVETT, D. Z.; VIGANÒ, A.; CAPITANIO, D.; VASSO, M. et al. Changes in muscle pro-  
854 teomics in the course of the Caudwell Research Expedition to Mt. Everest. *Proteomics*,  
855 v. 15, n. 1, p. 160-171, jan. 2015.
- 856 LEWIS, R. S.; DEEN, W. M. Kinetics of the reaction of nitric oxide with oxygen in aqueous  
857 solutions. *Chemical Research in Toxicology*, v. 7, n. 4, p. 568-574, jul./ago. 1994.
- 858 LIU, X.; MILLER, M. J.; JOSHI, M. S.; SADOWSKA-KROWICKA, H. et al. Diffusion-lim-  
859 ited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273,  
860 n. 30, p. 18709-18713, 24 jul. 1998.
- 861 LORENZO CALVO, J.; ALORDA-CAPO, F.; PAREJA-GALEANO, H.; JIMÉNEZ, S. L. In-  
862 fluence of nitrate supplementation on endurance cyclic sports performance: A systematic  
863 review. *Nutrients*, v. 12, n. 6, p. 1796, 2020.
- 864 LORIN, J.; ZELLER, M.; GUILLAND, J. C.; COTTIN, Y. et al. Arginine and nitric oxide  
865 synthase: regulatory mechanisms and cardiovascular aspects. *Molecular Nutrition &*  
866 *Food Research*, v. 58, n. 1, p. 101-116, jan. 2014.
- 867 LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide  
868 pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, n. 2, p.  
869 156-167, fev. 2008.
- 870 MACINTOSH, B. R.; SHAHI, M. R. A peripheral governor regulates muscle contraction.  
871 *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 36, n. 1, p. 1-11, fev. 2011.
- 872 MAGDER, S. The meaning of blood pressure. *Critical Care*, v. 22, n. 1, p. 257, 11 out.  
873 2018.
- 874 MAHAJ, A.; FISCHER, S. M.; DILLON, K. N.; KANG, Y. et al. Effects of L-Citrulline sup-  
875 plementation on endothelial function and blood pressure in hypertensive postmenopausal  
876 women. *Nutrients*, v. 14, n. 20, 20 out. 2022.
- 877 MAPS, World. Watermelon production. 2018. Disponível em: [https://worldmap-](https://worldmap-per.org/maps/watermelon-production/)  
878 [per.org/maps/watermelon-production/](https://worldmap-per.org/maps/watermelon-production/). Acesso em: 25 nov. 2018.
- 879 MARÍN-HERNÁNDEZ, A.; GALLARDO-PÉREZ, J. C.; RALPH, S. J.; RODRÍGUEZ-EN-  
880 RÍQUEZ, S. et al. HIF-1 $\alpha$  modulates energy metabolism in cancer cells by inducing

- 881 over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.  
882 9, n. 9, p. 1084-1101, ago. 2009.
- 883 MCHUGH, K. M.; DRAKE, R. L. Insulin-mediated regulation of epididymal fat pad malic  
884 enzyme. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 62, n. 2, p. 227-233, abr. 1989.
- 885 MCVEIGH, G. E.; HAMILTON, P.; WILSON, M.; HANRATTY, C. G. et al. Platelet nitric  
886 oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of sup-  
887 plemental ascorbate. *Circulation*, v. 106, n. 2, p. 208-213, 9 jul. 2002.
- 888 MICHEL, J. B. [Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system].  
889 *Pathologie Biologie*, v. 46, n. 3, p. 181-189, mar. 1998.
- 890 MILONE, S. D.; PACE-ASCIAC, C. R.; REYNAUD, D.; AZEVEDO, E. R. et al. Biochemi-  
891 cal, hemodynamic, and vascular evidence concerning the free radical hypothesis of ni-  
892 trate tolerance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 33, n. 5, p. 685-690, mai.  
893 1999.
- 894 MOINARD, C.; NICOLIS, I.; NEVEUX, N.; DARQUY, S. et al. Dose-ranging effects of  
895 citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects:  
896 the Citrudose pharmacokinetic study. *British Journal of Nutrition*, v. 99, n. 4, p. 855-862,  
897 abr. 2008.
- 898 MÖLLER, M.; BOTTI, H.; BATTYHANY, C.; RUBBO, H. et al. Direct measurement of  
899 nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low-density lipoprotein. *Journal of*  
900 *Biological Chemistry*, v. 280, n. 10, p. 8850-8854, 11 mar. 2005.
- 901 MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide as the en-  
902 dogenous nitrovasodilator. *Hypertension*, v. 12, n. 4, p. 365-372, out. 1988.
- 903 MOON, Y.; BALKE, J. E.; MADORMA, D.; SIEGEL, M. P. et al. Nitric oxide regulates  
904 skeletal muscle fatigue, fiber type, microtubule organization, and mitochondrial ATP syn-  
905 thesis efficiency through cGMP-dependent mechanisms. *Antioxidants & Redox Signaling*,  
906 v. 26, n. 17, p. 966-985, 10 jun. 2017.
- 907 MORRISON, R. J.; MILLER, C. C., 3rd; REID, M. B. Nitric oxide effects on force-velocity  
908 characteristics of the rat diaphragm. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A:*  
909 *Molecular & Integrative Physiology*, v. 119, n. 1, p. 203-209, jan. 1998.
- 910 MORTENSEN, S. P.; GONZÁLEZ-ALONSO, J.; DAMSGAARD, R.; SALTIN, B. et al. In-  
911 hibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing fac-  
912 tors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg. *The*  
913 *Journal of Physiology*, v. 581, n. Pt 2, p. 853-861, 2007.

- 914 MUNHOZ, A.; RIVA, P.; DE JESUS, D.; CURI, R. et al. Control of insulin secretion by  
915 production of reactive oxygen species: study performed in pancreatic islets from fed and  
916 48-hour fasted Wistar rats. *PLOS ONE*, v. 11, p. e0158166, 30 jun. 2016.
- 917 MURGIA, M.; TONIOLO, L.; NAGARAJ, N.; CICILIOT, S. et al. Single muscle fiber pro-  
918 teomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell Reports*, v. 19,  
919 n. 11, p. 2396-2409, 13 jun. 2017.
- 920 NGUYEN, H.; KOH, J. Y.; LI, H.; ISLAS-ROBLES, A. et al. A novel imidazolinone metfor-  
921 min-methylglyoxal metabolite promotes endothelial cell angiogenesis via the eNOS/HIF-  
922 1 $\alpha$  pathway. *FASEB Journal*, v. 35, n. 7, p. e21645, jul. 2021.
- 923 NGUYEN, T. H.; CONOTTE, S.; BELAYEW, A.; DECLÈVES, A. E. et al. Hypoxia and  
924 hypoxia-inducible factor signaling in muscular dystrophies: cause and consequences. *In-*  
925 *ternational Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, 5 jul. 2021.
- 926 NICKELS, T. J.; REED, G. W.; DRUMMOND, J. T.; BLEVINS, D. E. et al. Does nitric  
927 oxide modulate transmitter release at the mammalian neuromuscular junction? *Clinical*  
928 *and Experimental Pharmacology & Physiology*, v. 34, n. 4, p. 318-326, abr. 2007.
- 929 NISOLI, E.; FALCONE, S.; TONELLO, C.; COZZI, V. et al. Mitochondrial biogenesis by  
930 NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proceedings of the National*  
931 *Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 47, p. 16507-16512, 23  
932 nov. 2004.
- 933 NYBERG, M.; BLACKWELL, J. R.; DAMSGAARD, R.; JONES, A. M. et al. Lifelong phys-  
934 ical activity prevents an age-related reduction in arterial and skeletal muscle nitric oxide  
935 bioavailability in humans. *The Journal of Physiology*, v. 590, n. 21, p. 5361-5370, 1 nov.  
936 2012.
- 937 PAPADIA, C.; OSOWSKA, S.; CYNOBER, L.; FORBES, A. Citrulline in health and dis-  
938 ease: review on human studies. *Clinical Nutrition*, v. 37, n. 6 Pt A, p. 1823-1828, dez.  
939 2018.
- 940 PARK, J. W.; THOMAS, S. M.; SCHECHTER, A. N.; PIKNOVA, B. Control of rat muscle  
941 nitrate levels after perturbation of steady state dietary nitrate intake. *Nitric Oxide*, v. 109-  
942 110, p. 42-49, 1 mai. 2021.
- 943 PERCIVAL, J. M. nNOS regulation of skeletal muscle fatigue and exercise performance.  
944 *Biophysical Reviews*, v. 3, n. 4, p. 209-217, dez. 2011.
- 945 PIEC, I.; LISTRAT, A.; ALLIOT, J.; CHAMBON, C. et al. Differential proteome analysis of  
946 aging in rat skeletal muscle. *FASEB Journal*, v. 19, n. 9, p. 1143-1145, jul. 2005.

- 947 PIKNOVA, B.; PARK, J. W.; KWAN JEFF LAM, K.; SCHECHTER, A. N. Nitrate as a  
948 source of nitrite and nitric oxide during exercise hyperemia in rat skeletal muscle. *Nitric*  
949 *Oxide*, v. 55-56, p. 54-61, 1 mai. 2016.
- 950 PIKNOVA, B.; SCHECHTER, A. N.; PARK, J. W.; VANHATALO, A. et al. Skeletal muscle  
951 nitrate as a regulator of systemic nitric oxide homeostasis. *Exercise and Sport Sciences*  
952 *Reviews*, v. 50, n. 1, p. 2-13, 1 jan. 2022.
- 953 PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; VILALVA, K. H.; TOLEDO, J. C. et al. Contrasting  
954 effects of low versus high ascorbate doses on blood pressure responses to oral nitrite in  
955 L-NAME-induced hypertension. *Nitric Oxide*, v. 74, p. 65-73, 1 abr. 2018.
- 956 PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C. et al. In-  
957 crease in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radical*  
958 *Biology and Medicine*, v. 53, n. 4, p. 701-709, 15 ago. 2012.
- 959 POEGGELER, B.; SINGH, S. K.; SAMBAMURTI, K.; PAPPOLLA, M. A. Nitric oxide as a  
960 determinant of human longevity and health span. *International Journal of Molecular Sci-*  
961 *ences*, v. 24, n. 19, 26 set. 2023.
- 962 PUNKT, K.; FRITZSCHE, M.; STOCKMAR, C.; HEPP, P. et al. Nitric oxide synthase in  
963 human skeletal muscles related to defined fibre types. *Histochemistry and Cell Biology*,  
964 v. 125, n. 5, p. 567-573, mai. 2006.
- 965 RAJCIC, D.; KROMM, F.; HERNÁNDEZ-ARRIAGA, A.; BRANDT, A. et al. Supplementing  
966 L-citrulline can extend lifespan in *C. elegans* and attenuate the development of aging-  
967 related impairments of glucose tolerance and intestinal barrier in mice. *Biomolecules*, v.  
968 13, n. 11, 26 out. 2023.
- 969 RAMSEY, K. A.; BAKKER, A. J.; PINNIGER, G. J. Fiber-type dependence of stretch-  
970 induced force enhancement in rat skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, v. 42, n. 5, p. 769-  
971 777, nov. 2010.
- 972 RANATUNGA, K. W.; THOMAS, P. E. Correlation between shortening velocity, force-  
973 velocity relation and histochemical fibre-type composition in rat muscles. *Journal of Mus-*  
974 *cle Research and Cell Motility*, v. 11, n. 3, p. 240-250, jun. 1990.
- 975 REZAEI, S.; GHOLAMALIZADEH, M.; TABRIZI, R.; NOWROUZI-SOHRABI, P. et al. The  
976 effect of L-arginine supplementation on maximal oxygen uptake: a systematic review and  
977 meta-analysis. *Physiological Reports*, v. 9, n. 3, p. e14739-e14739, 2021.
- 978 RHIM, Hye Chang; KIM, Sung Jong; PARK, Jewel; JANG, Ki-Mo. Effect of citrulline on  
979 post-exercise rating of perceived exertion, muscle soreness, and blood lactate levels: A  
980 systematic review and meta-analysis. *Journal of Sport and Health Science*, v. 9, n. 6, p.

- 981 553-561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.02.001>. Acesso em: 3  
982 mar. 2025.
- 983 ROGERS, J. M.; GILLS, J.; GRAY, M. Acute effects of Nitrosigine® and citrulline malate  
984 on vasodilation in young adults. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, v.  
985 17, n. 1, p. 12, 24 fev. 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1186/s12970-020-00356-](https://doi.org/10.1186/s12970-020-00356-7)  
986 7. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 987 RYAN, N. A.; ZWETSLOOT, K. A.; WESTERKAMP, L. M.; HICKNER, R. C. et al. Lower  
988 skeletal muscle capillarization and VEGF expression in aged vs. young men. *Journal of*  
989 *Applied Physiology*, v. 100, n. 1, p. 178-185, jan. 2006. Disponível em:  
990 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01009.2005>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 991 SANDER, J. Formation of carcinogenic nitroso compounds in the stomach of laboratory  
992 animals and the consequences for man. 3. *Arzneimittelforschung*, v. 21, n. 12, p. 2034-  
993 2039, dez. 1971.
- 994 SANDER, J. The importance of nitrate, nitrite and amines in water for development of  
995 carcinogenic N-nitroso compounds. *Schriftenreihe für Wasser-, Boden- und Lufthygiene*,  
996 v. 40, p. 67-78, 1973.
- 997 SANSBURY, B. E.; CUMMINS, T. D.; TANG, Y.; HELLMANN, J. et al. Overexpression of  
998 endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte  
999 phenotype. *Circulation Research*, v. 111, n. 9, p. 1176-1189, 12 out. 2012. Disponível  
1000 em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.270888>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1001 SAXENA, Saurabh; SHUKLA, Dhananjay; BANSAL, Anju. Augmentation of aerobic res-  
1002 piration and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by hypoxia preconditioning with  
1003 cobalt chloride. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 264, n. 3, p. 324-334, nov.  
1004 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.010>. Acesso em: 3 mar.  
1005 2025.
- 1006 SCHOORS, S.; BRUNING, U.; MISSIAEN, R.; QUEIROZ, K. C. et al. Fatty acid carbon  
1007 is essential for dNTP synthesis in endothelial cells. *Nature*, v. 520, n. 7546, p. 192-197,  
1008 9 abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14287>. Acesso em: 3 mar.  
1009 2025.
- 1010 SCHRAGE, William G.; WILKINS, Brad W.; JOHNSON, Christopher P.; EISENACH, John  
1011 H. et al. Roles of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in leg vasodilation and oxygen  
1012 consumption during prolonged low-intensity exercise in untrained humans. *Journal of Ap-*  
1013 *plied Physiology*, v. 109, n. 3, p. 768-777, 2010. Disponível em:  
1014 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00069.2010>. Acesso em: 3 mar. 2025.

- 1015 SCHWEDEHELM, E.; MAAS, R.; FREESE, R.; JUNG, D. et al. Pharmacokinetic and  
1016 pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide me-  
1017 tabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 65, n. 1, p. 51-59, jan. 2008. Dis-  
1018 ponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2007.03092.x>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1019 SHOHET, R. V.; GARCIA, J. A. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators  
1020 of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *Journal of Molecular Medicine*  
1021 *(Berlin)*, v. 85, n. 12, p. 1309-1315, dez. 2007. Disponível em:  
1022 <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0279-6>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1023 SIMINO, L. A. P.; FONTANA, M. F.; DE FANTE, T.; PANZARIN, C. et al. Hepatic epige-  
1024 netic reprogramming after liver resection in offspring alleviates the effects of maternal  
1025 obesity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 830009, 2022. Disponível  
1026 em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.830009>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1027 SIMMEN, F. A.; ALHALLAK, I.; SIMMEN, R. C. M. Malic enzyme 1 (ME1) in the biology  
1028 of cancer: it is not just intermediary metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.  
1029 65, n. 4, p. R77-R90, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JME-20-0106>.  
1030 Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1031 SOCHA, M. J.; SEGAL, S. S. Microvascular mechanisms limiting skeletal muscle blood  
1032 flow with advancing age. *Journal of Applied Physiology (1985)*, v. 125, n. 6, p. 1851-1859,  
1033 1 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00593.2018>. Acesso em:  
1034 3 mar. 2025.
- 1035 SPARACINO-WATKINS, Courtney E.; LAI, Yen-Chun; GLADWIN, Mark T. Nitrate-nitrite-  
1036 nitric oxide pathway in pulmonary arterial hypertension therapeutics. *Circulation*, v. 125,  
1037 n. 23, p. 2824-2826, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1161/CIRCULATION-](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114581)  
1038 [NAHA.112.114581](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.114581). Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1039 STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiolo-*  
1040 *gical Reviews*, v. 81, n. 1, p. 209-237, jan. 2001. Disponível em:  
1041 <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.209>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1042 STREETER, Daniel M.; TRAUTMAN, Kara A.; BENNETT, Tylor W.; McINTOSH, Lauren  
1043 E. et al. Endothelial, cardiovascular, and performance responses to L-arginine intake and  
1044 resistance exercise. *International Journal of Exercise Science*, v. 12, n. 2, p. 701-713,  
1045 2019. Disponível em: <https://digitalcommons.wku.edu/ijes/vol12/iss2/15>. Acesso em: 3  
1046 mar. 2025.
- 1047 STUEHR, D. J.; GRIFFITH, O. W. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzy-*  
1048 *mology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 65, p. 287-346, 1992. Disponível em:  
1049 <https://doi.org/10.1002/9780470123037.ch6>. Acesso em: 3 mar. 2025.

- 1050 SUREDA, A.; PONS, A. Arginine and citrulline supplementation in sports and exercise:  
1051 ergogenic nutrients? *Medicine and Sport Science*, v. 59, p. 18-28, 2012. Disponível em:  
1052 <https://doi.org/10.1159/000338342>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1053 TANAKA, Y.; YAMAKI, F.; KOIKE, K.; TORO, L. New insights into the intracellular mech-  
1054 anisms by which PGI2 analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-  
1055 protein mediated-activation of MaxiK channel. *Current Medicinal Chemistry - Cardiovas-*  
1056 *cular & Hematological Agents*, v. 2, n. 3, p. 257-265, jul. 2004. Disponível em:  
1057 <https://doi.org/10.2174/1568016043405164>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1058 TARONI, F.; DI DONATO, S. Purification and properties of cytosolic malic enzyme from  
1059 human skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry*, v. 20, n. 8, p. 857-866,  
1060 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(88\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0020-711X(88)90074-4). Acesso em: 3 mar.  
1061 2025.
- 1062 THOMAS, D. D.; LIU, X.; KANTROW, S. P.; LANCASTER, J. R., Jr. The biological lifetime  
1063 of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O2. *Proceedings of*  
1064 *the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 1, p. 355-  
1065 360, 2 jan. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.011413798>. Acesso em: 3  
1066 mar. 2025.
- 1067 TORRES, S. H.; DE SANCTIS, J. B.; DE BRICENO, L. M.; HERNANDEZ, N. et al. In-  
1068 flammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *Jour-*  
1069 *nal of Endocrinology*, v. 181, n. 3, p. 419-427, 1 jun. 2004. Disponível em:  
1070 <https://doi.org/10.1677/joe.0.1810419>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1071 TREXLER, E. T.; PERSKY, A. M.; RYAN, E. D.; SCHWARTZ, T. A. et al. Acute effects  
1072 of citrulline supplementation on high-intensity strength and power performance: a sys-  
1073 tematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, v. 49, n. 5, p. 707-718, mai. 2019.  
1074 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01111-4>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1075 TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and  
1076 nitrate in human biological fluids. *Free Radical Research*, v. 39, n. 8, p. 797-815, ago.  
1077 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10715760500308551>. Acesso em: 3 mar.  
1078 2025.
- 1079 TSUKAHARA, H.; GORDIENKO, D. V.; TONSHOFF, B.; GELATO, M. C. et al. Direct  
1080 demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial  
1081 cells. *Kidney International*, v. 45, n. 2, p. 598-604, fev. 1994. Disponível em:  
1082 <https://doi.org/10.1038/ki.1994.87>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1083 VAN FAASSEN, E. E.; BAHRAMI, S.; FEELISCH, M.; HOGG, N. et al. Nitrite as regulator  
1084 of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Medical Research Reviews*, v. 29, n. 5, p.



- 1085 683-741, set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.20156>. Acesso em: 3  
1086 mar. 2025.
- 1087 WANG, Y.; EL-ZARU, M. R.; SURKS, H. K.; MENDELSON, M. E. Formin homology  
1088 domain protein (FHOD1) is a cyclic GMP-dependent protein kinase I-binding protein and  
1089 substrate in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 23,  
1090 p. 24420-24426, 4 jun. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M401134200>.  
1091 Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1092 WELCH, Hugh G.; STAINSBY, Wendell N. Oxygen debt in contracting dog skeletal mus-  
1093 cle in situ. *Respiration Physiology*, v. 3, n. 2, p. 229-242, 1 out. 1967. Disponível em:  
1094 [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(67\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(67)90079-5). Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1095 WIGSTON, D. J.; ENGLISH, A. W. Fiber-type proportions in mammalian soleus muscle  
1096 during postnatal development. *Journal of Neurobiology*, v. 23, n. 1, p. 61-70, fev. 1992.  
1097 Disponível em: <https://doi.org/10.1002/neu.480230106>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1098 WIJNANDS, K. A.; VINK, H.; BRIEDÉ, J. J.; VAN FAASSEN, E. E. et al. Citrulline a more  
1099 suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during  
1100 endotoxemia. *PLOS ONE*, v. 7, n. 5, p. e37439, 2012. Disponível em:  
1101 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037439>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1102 WILSON, J. R.; KAPOOR, S. C. Contribution of prostaglandins to exercise-induced vas-  
1103 odilation in humans. *American Journal of Physiology*, v. 265, n. 1 Pt 2, p. H171-H175, jul.  
1104 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.1.H171>. Acesso em: 3  
1105 mar. 2025.
- 1106 WONG, S. A.; DROVANDI, A.; JONES, R.; GOLLEDGE, J. Effect of dietary supplements  
1107 which upregulate nitric oxide on walking and quality of life in patients with peripheral artery  
1108 disease: A meta-analysis. *Biomedicines*, v. 11, n. 7, 29 jun. 2023. Disponível em:  
1109 <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071862>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1110 WU, G.; MORRIS, S. M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical*  
1111 *Journal*, v. 336, Pt 1, n. Pt 1, p. 1-17, 15 nov. 1998. Disponível em:  
1112 <https://doi.org/10.1042/bj3360001>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1113 YANG, B. K.; VIVAS, E. X.; REITER, C. D.; GLADWIN, M. T. Methodologies for the sen-  
1114 sitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological  
1115 samples. *Free Radical Research*, v. 37, n. 1, p. 1-10, jan. 2003. Disponível em:  
1116 <https://doi.org/10.1080/1071576031000070855>. Acesso em: 3 mar. 2025.
- 1117 YOKOM, A. L.; MORISHIMA, Y.; LAU, M.; SU, M. et al. Architecture of the nitric-oxide  
1118 synthase holoenzyme reveals large conformational changes and a calmodulin-driven re-  
1119 lease of the FMN domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 24, p. 16855-16865,

- 1120 13 jun. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567106>. Acesso em: 3  
1121 mar. 2025.
- 1122 ZACHARIA, I. G.; DEEN, W. M. Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline.  
1123 *Annals of Biomedical Engineering*, v. 33, n. 2, p. 214-222, fev. 2005. Disponível em:  
1124 <https://doi.org/10.1007/s10462-005-0010-9>. Acesso em: 3 mar. 2025.  
1125

**Table 1.** Genetic sequences used to perform RT-qPCR in the analysis of the effects of acute oral supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate in adult rats

| Gene  | Sense sequency           | Anti-sense sequency    |
|---|--------------------------|------------------------|
| <b>NOS1<sup>1</sup></b>                     | TGGCAACAGCGACAATTTGA     | CACCCGAAGACCAGAACCAT   |
| <b>NOS3<sup>2</sup></b>                     | CCGGCGCTACGAAGAATG       | CAGTGCCACGGATGGAAATT   |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math><sup>3</sup></b> | CCCTACTATGTCGCTTTCTTGG   | GTTTCTGCTGCCTTGTATGGG  |
| <b>VEGF<sup>4</sup></b>                     | AGGCCGAAGTCTGTTTGCCTGC   | TCAGGGCCAGGGATGGGTTTGT |
| <b><math>\beta</math>-actin<sup>5</sup></b> | AGATGACCCAGATCATGTTTGAGA | ACCAGAGGCATACAGGGACAA  |

1126 <sup>1</sup> Nitric oxide synthase type 1 - Neuronal nitric oxide synthase gene.

1127 <sup>2</sup> Nitric oxide synthase type 3 – Endothelium nitric oxide synthase gene.

1128 <sup>3</sup> Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene.

1129 <sup>4</sup> Vascular endothelial growth factor gene.

1130 <sup>5</sup> Endogenous control gene.

## 1131 **Figure Legend**

1132 **Figure 1:** Overview of the experimental design to evaluate the effects of the acute oral  
1133 supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on oxide nitric (NO) metabolism  
1134 and expression of NO-related genes and angiogenic genes (HIF-1 $\alpha$  and VEGF) in the  
1135 muscle of adult rats. n = number of animals. d = days of life. (♂) Male rats. Control: not  
1136 supplementation. Vehicle: water intake. L-Citrulline: intake of 170mg per kg of animal  
1137 weight of L-Citrulline. L-Citrulline Malate: intake of 260mg per kg of animal weight of L-  
1138 Citrulline Malate (2:1). Six animals from each group had death induced 90 minutes (90')  
1139 after supplementation, and the other half, 270 minutes after (350'). (Ⓢ) Induction of death.  
1140 (🔴) Blood/plasma. [ ] Plasma concentrations; EDL: Extensor digitorum longus muscle  
1141 (EDL). EG: Gene expression. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrite; RxNO: Nitrous compounds. Tis-  
1142 sues were collected for subsequent quantification of plasma metabolites, muscle metab-  
1143 olites and gene expression in muscle.

1144

1145 **Figure 2:** Effects of acute oral supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on  
1146 plasma concentrations of nitrite (A) and nitrate (B) in adult rats. At 210 days of life, 44  
1147 male rats (390  $\pm$  29 g) were randomized to Control (not supplemented), Vehicle (gavage  
1148 with water), L-Citrulline (170 mg per kg of animal weight) or L-Citrulline Malate (170 mg  
1149 L-Citrulline: 86 mg Malate per kg of animal weight). Six animals from each group had  
1150 plasma collected at 90 min and the others at 270 min after ingestion. Data are shown as  
1151 mean  $\pm$  S.E.M (n= 4 - 6 per group). Normality was verify using the Shapiro-Wilk test, and  
1152 Two Way ANOVA to determine the effects of the supplement, time after ingestion, and  
1153 supplement-time interaction. (\*) Higher than the Control group at the same point in time.

(#) Higher than the Vehicle group at the same point in time. (a) lower than the group itself at 90 minutes. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrite; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate; S.E.M.: standard error of mean.

**Figure 3:** Effects of acute oral supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on muscle concentrations of nitrite, nitrate and nitrous compounds of nitric oxide in adult rats. At 210 days of life, 44 male rats (390  $\pm$  29 g) were randomized to Control (not supplemented; n = 12), Vehicle (gavage with water; n = 12), L-Citrulline (170 mg per kg of animal weight; n = 12) or L-Citrulline Malate (170 mg L-Citrulline: 86 mg Malate per kg of animal weight; n = 12). Six animals from each group had muscles collected at 90 min and the others at 270 min after ingestion. A: nitrite concentrations in EDL. B: nitrite concentrations in soleus. C: nitrate concentrations in EDL. D: nitrate concentrations in soleus. E: nitrous compounds in EDL. F: nitrous compounds in soleus. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M (n= 4 - 6 per group). Normality was verify using the Shapiro-Wilk test, and Two Way ANOVA to determine the effects of the supplement, time after ingestion, and supplement-time interaction. (\*) Higher than the control group at the same point in time. (#) Higher than the Vehicle group at the same point in time. (ε) Higher than the L-Citrulline group at the same point in time. (a) Lower than the group itself at 90 minutes. (b) Higher than the group itself at 90 minutes. EDL: *Extensor digitorum longus* muscle. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrite; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate; RxNO: Nitrous compounds; S.E.M.: standard error of mean.

**Figure 4.** Effects of acute oral supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on the expression of genes encoding NOS1 and NOS3 in the muscle of adult rats. At 210 days of life, 44 male rats (390  $\pm$  29 g) were randomized to Control (not supplemented),

Vehicle (gavage with water), L-Citrulline (170 mg per kg of animal weight) or L-Citrulline Malate (170 mg L-Citrulline: 86 mg Malate per kg of animal weight). Six animals from each group had muscles collected at 90 min and the others at 270 min after ingestion. **A:** NOS1 gene expression in EDL. **B:** NOS1 gene expression in soleus. **C:** NOS3 gene expression in EDL. **D:** NOS3 gene expression in soleus. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M (n= 4 - 6 per group). Normality was verify using the Shapiro-Wilk test, and Two Way ANOVA to determine the effects of the supplement, time after ingestion, and supplement-time interaction. (\*) Higher than the control group at the same point in time. (#) Higher than the Vehicle group at the same point in time. (b) Bigger than the group itself at 90 minutes. (a) lower than the group itself at 90 minutes. EDL: *Extensor digitorum longus* muscle. NOS1: Nitric oxide synthase type 1; NOS3: Nitric oxide synthase type 3; S.E.M.: standard error of mean.

**Figure 5.** Effects of acute supplementation with L-Citrulline or L-Citrulline Malate on the expression of genes encoding Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the muscle of adult rats. At 210 days of life, 44 male rats (390  $\pm$  29 g) were randomized to Control (not supplemented), Vehicle (gavage with water), L-Citrulline (170 mg per kg of animal weight) or L-Citrulline Malate (170 mg L-Citrulline: 86 mg Malate per kg of animal weight). Six animals from each group had muscles collected at 90 min and the others at 270 min after ingestion. **A:** expression of HIF-1 $\alpha$  gene in the EDL. **B:** expression of HIF-1 $\alpha$  gene in the soleus. **C:** expression of VEGF gene in the EDL. **D:** expression of VEGF gene in the soleus. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M (n= 4 - 6 per group). Normality was verify using the Shapiro-Wilk test, and Two

1200 Way ANOVA to determine the effects of the supplement, time after ingestion, and sup-  
1201 plement-time interaction. (\*) Higher than the control group at the same point in time. (#)  
1202 Higher than the Vehicle group at the same point in time. ( $\epsilon$ ) Higher than the L-Citrulline  
1203 Malate group at the same point in time. EDL: *Extensor digitorum longus* muscle. HIF-1 $\alpha$ :  
1204 Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene. S.E.M.: standard error of main. VEGF: Vascular endo-  
1205 thelial growth factor.

1206

1207 **Figure 6.** Graphic summary of the differential effects produced by the acute ingestion of  
1208 L-Citrulline Malate and the possible related mechanisms of action. EDL: *Extensor digito-*  
1209 *rum longus* muscle. EDL: *Extensor digitorum longus* muscle. HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible  
1210 factor-1 $\alpha$ . NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced. N=O: Nitric  
1211 oxide. NOS1: Nitric oxide synthase type 1; NOS3: Nitric oxide synthase type 3.

Increased nitric oxide metabolism, expression of NOS1 and HIF-1 $\alpha$  genes in muscle after acute supplementation of L-Citrulline or L-Citrulline Malate: different responses between EDL and soleus  
Ana Paula da Fonseca Arcoverde-Mello

**Figure 1. Overview of experimental design of the study**

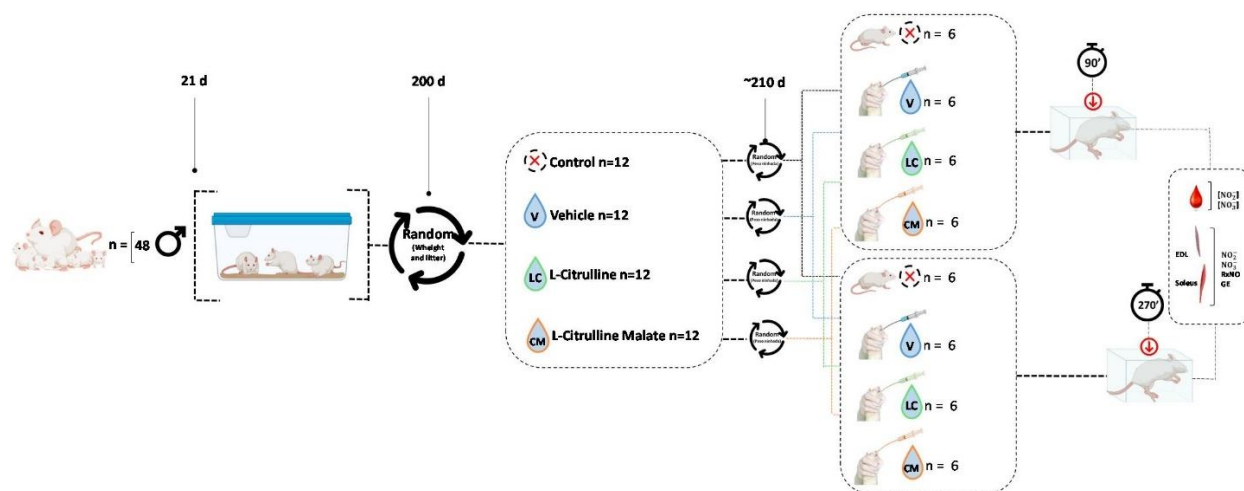




Figure 2.

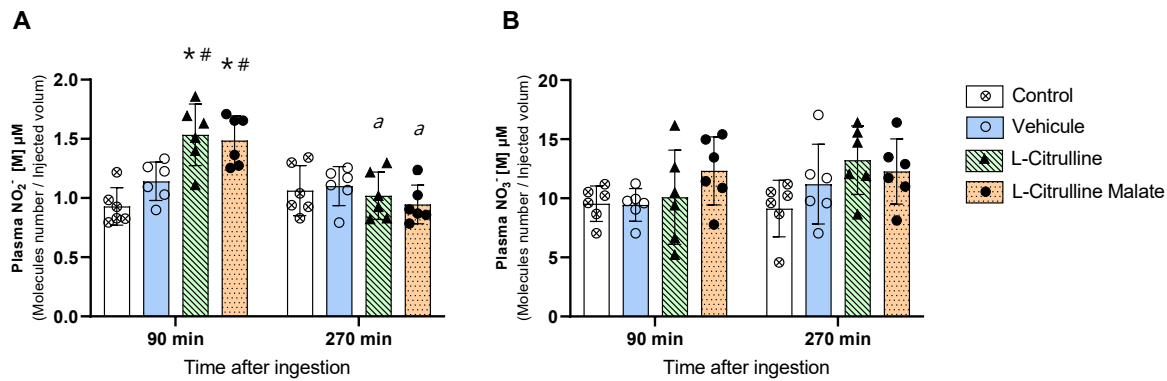
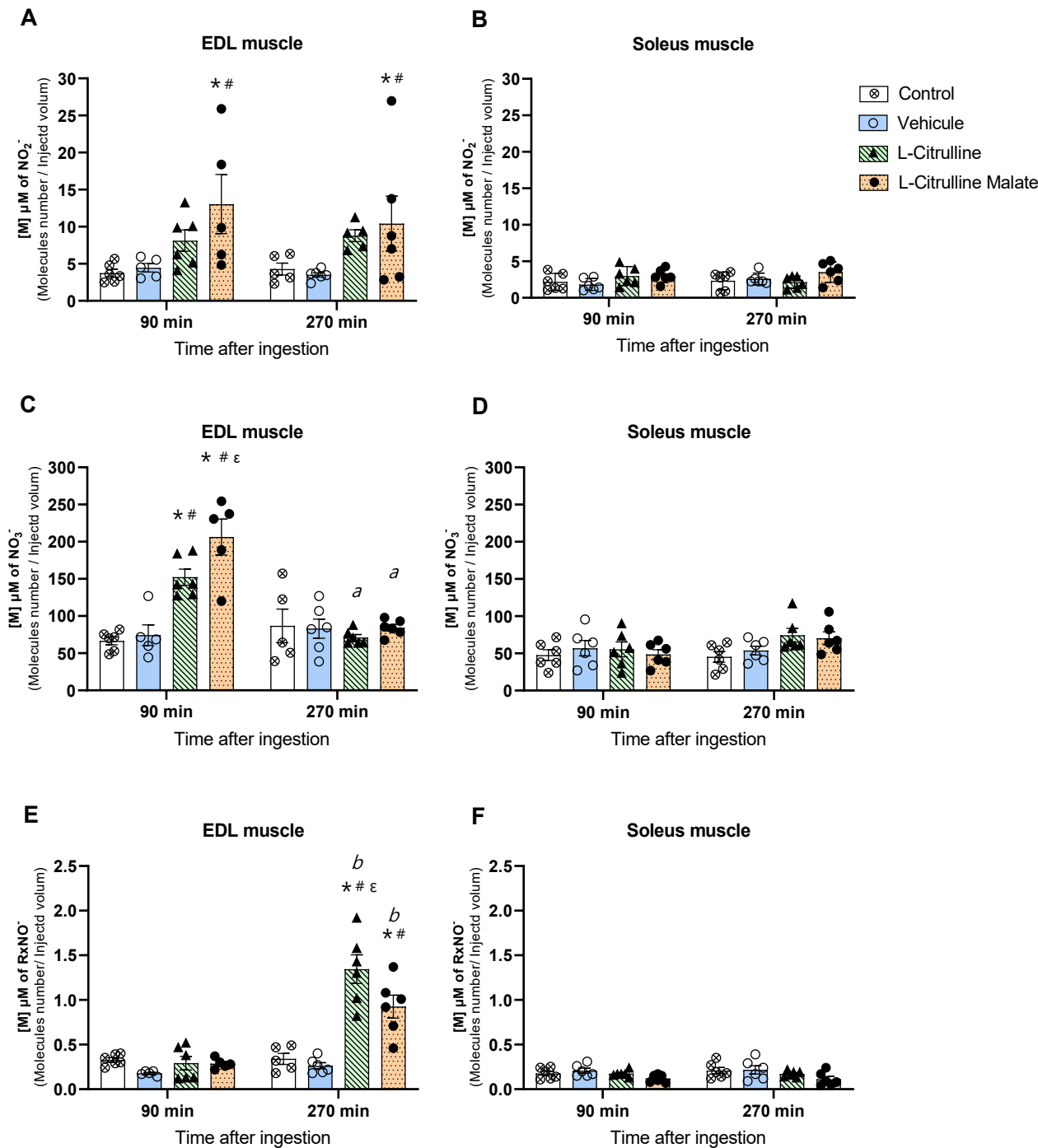


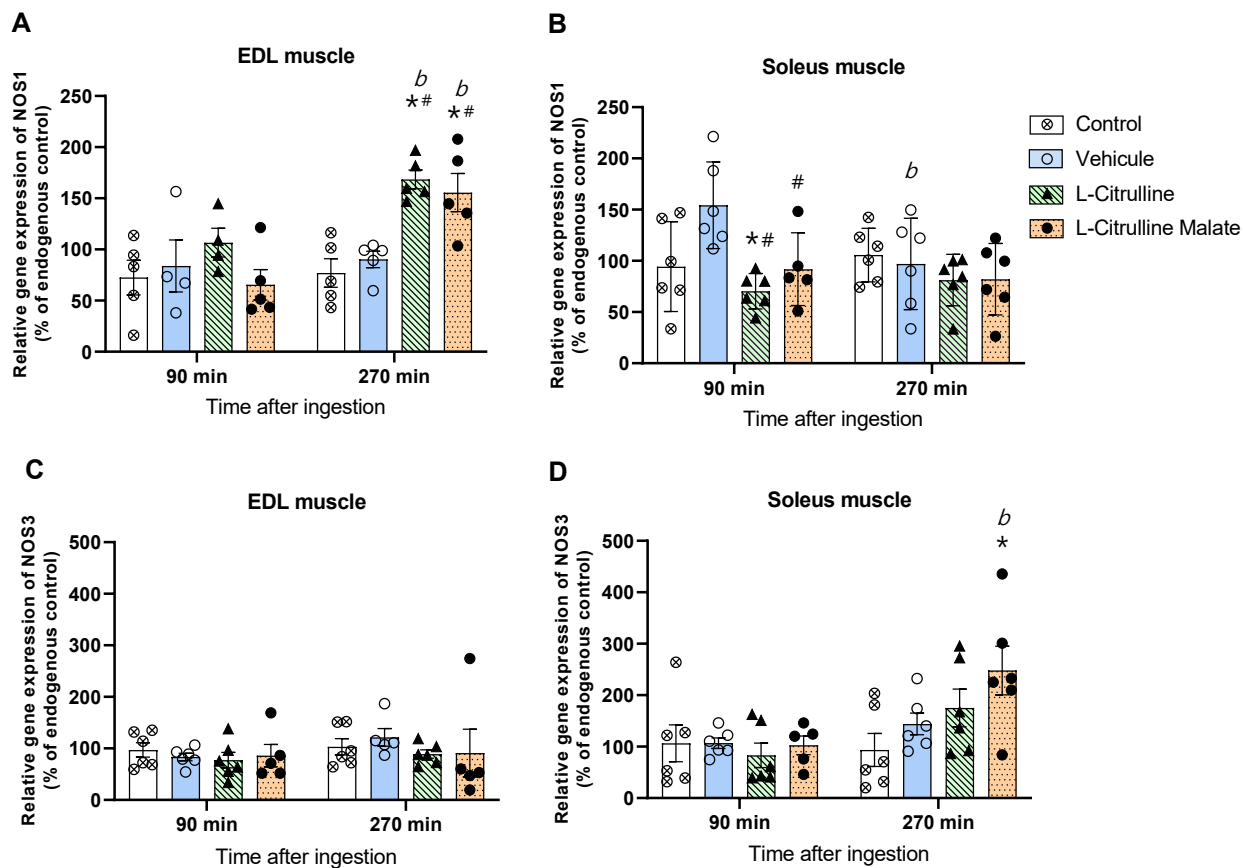
Figure 3.



Increased nitric oxide metabolism, expression of NOS1 and HIF-1 $\alpha$  genes in muscle after acute supplementation of L-Citrulline or L-Citrulline Malate: different responses between EDL and soleus

Ana Paula da Fonseca Arcoverde-Mello

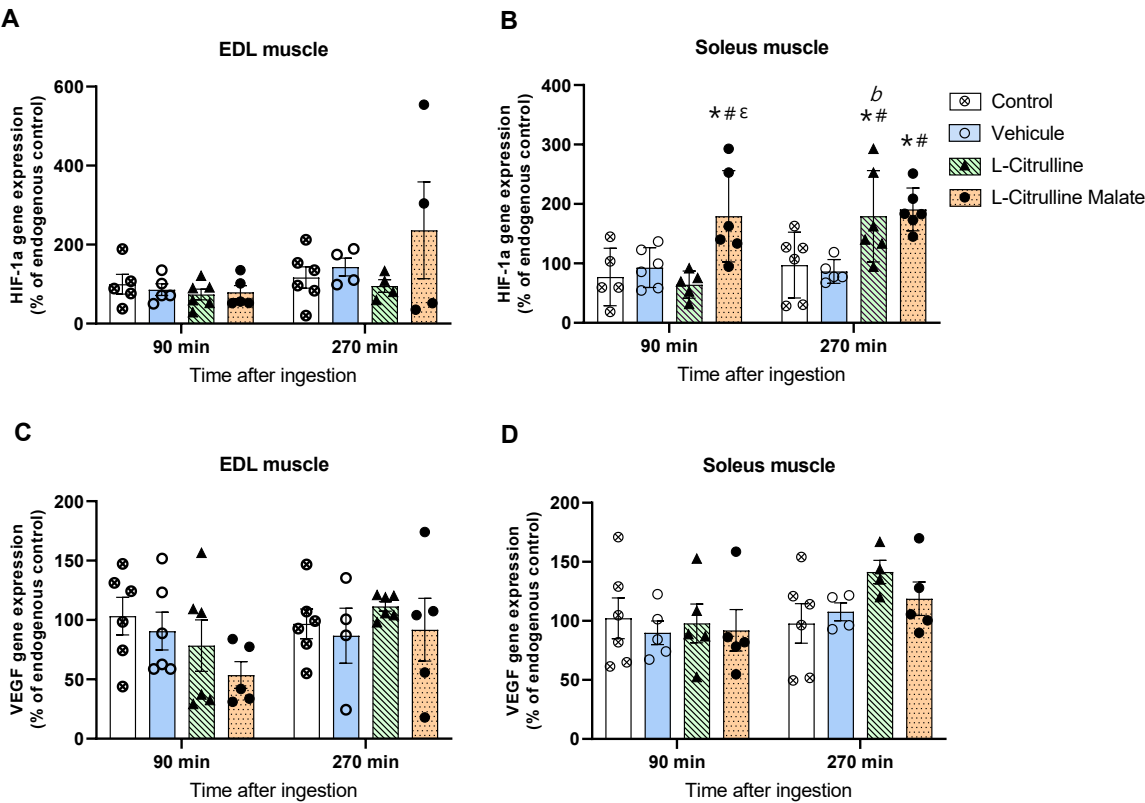
**Figure 4.**



Increased nitric oxide metabolism, expression of NOS1 and HIF-1 $\alpha$  genes in muscle after acute supplementation of L-Citrulline or L-Citrulline Malate: different responses between EDL and soleus

Ana Paula da Fonseca Arcoverde-Mello

Figure 5.



Increased nitric oxide metabolism, expression of NOS1 and HIF-1 $\alpha$  genes in muscle after acute supplementation of L-Citrulline or L-Citrulline Malate: different responses between EDL and soleus

Ana Paula da Fonseca Arcoverde-Mello

Figure 6.

