

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Potencial terapêutico da suplementação
com L-arginina e L-citrulina na doença
cardiovascular**

Nuno Miguel Fernando Lopes

Monografia orientada pelo Professor Doutor Henrique Nuno Nazaré e
Silva, Professor Auxiliar Convidado

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Potencial terapêutico da suplementação com L-arginina e L-citrulina na doença cardiovascular

Nuno Miguel Fernando Lopes

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pelo Professor Doutor Henrique Nuno Nazaré E
Silva, Professor Auxiliar Convidado

2021

Resumo

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e de mortalidade a nível mundial, sendo da máxima importância explorar novas estratégias farmacoterapêuticas por forma a retardar a sua progressão e minimizar o impacto na vida dos doentes. O endotélio vascular desempenha um papel fundamental no funcionamento do sistema cardiovascular, sendo responsável, entre outras funções, pela regulação do tónus vascular, sendo o monóxido de azoto (NO) o vasodilatador mais importante neste aspeto. As DCV acompanham-se frequentemente pela disfunção endotelial, caracterizada pela diminuição da biodisponibilidade de NO, que acelera a sua progressão e piora o prognóstico. De forma a reverter esta situação, tem sido estudada a possibilidade de aumentar a biodisponibilidade do NO através dos aminoácidos L-arginina e L-citrulina, diretamente envolvidos na síntese daquele mediador. Com este trabalho pretende-se sistematizar a informação sobre a utilização destes dois aminoácidos no contexto de diversas disfunções e patologias caracterizadas por disfunção endotelial, nomeadamente o envelhecimento vascular, disfunções neurológicas, disfunção erétil, fenómeno de Raynaud, hipertensão, sépsis, explorando-se ainda a sua utilidade enquanto potenciador da função cardiovascular durante o exercício físico. De uma forma geral, tanto a L-arginina como a L-citrulina mostraram efeitos positivos no aumento da biodisponibilidade do NO, bem como na redução de marcadores inflamatórios de diversas patologias. O aumento da ação vasodilatadora mostrou-se eficaz no tratamento de doenças como a hipertensão e a disfunção erétil, tendo reduzido a pressão arterial e aumentado a satisfação destes doentes, respetivamente. Estes resultados mostram-se animadores na utilização da suplementação destes aminoácidos na DCV, sendo necessário, no entanto, estudos mais robustos que confirmem a sua utilidade e definam com maior clareza as populações de doentes que beneficiam com esta suplementação, bem como os estadios da doença em que esta suplementação é eficaz e as respetivas doses, sendo que os presentes estudos apontam para o seu uso em combinação com terapêutica farmacológica já existente.

Palavras-chave: arginina, citrulina, doenças cardiovasculares, endotélio, monóxido de azoto

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the main causes of morbidity and mortality worldwide, and it is of utmost importance to explore new pharmacotherapeutic strategies in order to slow down their progression and minimise the impact on patients lives. The vascular endothelium plays a key role in the functioning of the cardiovascular system, being responsible, among other functions, for the regulation of vascular tone, being nitric oxide (NO) the most important vasodilator in this aspect. CVDs are frequently accompanied by endothelial dysfunction, characterised by decreased NO bioavailability, which accelerates their progression and worsens prognosis. In order to reverse this situation, the possibility of increasing the bioavailability of NO through the supplementation with amino acids L-arginine and L-citrulline, directly involved in the synthesis of NO, has been studied. This work aims to systematize the information on the use of these two amino acids in the context of various dysfunctions and pathologies characterized by endothelial dysfunction, including vascular aging, neurological dysfunction, erectile dysfunction, Raynaud's phenomenon, hypertension, sepsis and exploring its utility as a booster of cardiovascular function during physical exercise. In general, both L-arginine and L-citrulline have shown positive effects in increasing the bioavailability of NO, as well as in reducing inflammatory markers of various pathologies. The increase in vasodilator action was shown to be effective in treating diseases such as hypertension and erectile dysfunction, having reduced blood pressure and increased the satisfaction of these patients, respectively. These results are encouraging in the use of supplementation of these amino acids in CVD, but more robust studies are needed to confirm their usefulness and define more clearly the populations of patients who benefit from this supplementation, as well as the stages of the disease in which this supplementation is effective and the respective doses.

Keywords: arginine, cardiovascular diseases, citrulline, endothelium, nitric oxide

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, por tudo o que fizeram até este momento e por tudo o que me ensinaram. Nada disto seria possível sem o vosso apoio.

Agradeço também à minha família por todo o incentivo e pelo apoio que sempre deram, foram essenciais neste trajeto.

Aos meus amigos por estarem sempre comigo, pelas memórias criadas e por muitas outras ainda por viver.

À minha namorada, que esteve sempre lá nos melhores e nos piores dias, por apoiar todos os meus sonhos e por me atuar todos os dias. O teu apoio significa tudo para mim.

Por fim, tenho que agradecer ao orientador desta monografia, o Professor Doutor Henrique Nuno Nazaré E Silva, por todos os ensinamentos que transmitiu e por todo o esforço que teve com este trabalho, tentando sempre aproximar esta monografia da perfeição.

A todos, o meu muito obrigado.

Abreviaturas

ADMA – Dimetil arginina assimétrica

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

BH₄ – Tetrahidrobiopterina

CAT-1 – Transportador catiónico de aminoácidos-1

cGMP – Guanosina monofosfato cíclico

COPD – Doença pulmonar obstrutiva crónica

DA – Doença de Alzheimer

DCV – Doenças cardiovasculares

DE – Disfunção erétil

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DV – Demência vascular

EDHF – Fator hiperpolarizante dependente do endotélio

eNOS – Monóxido de azoto sintase endotelial

GFR – Taxa de filtração glomerular

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GTP – Guanosina trifosfato

HbA1c – Hemoglobina glicada

HO-1 – Heme oxigenase-1

HUVEC – Célula endotelial das veias umbilicais

ICC – Insuficiência cardíaca congestiva

IIEF – International Index of Erectile Function

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

iNOS – Monóxido de azoto sintase induzível

iPDE5 – Inibidores da 5-fosfodiasterase

I/R – Isquémia/reperfusão

L-NAME – Nitro L-arginina metil éster

logP – Coeficiente de partição

MDA – Malondialdeído

MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês

MPO – Mieloperoxidase

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nNOS – Monóxido de azoto sintase neuronal

NO – Monóxido de azoto

NOS – Monóxido de azoto sintase

O₂ – Oxigénio

O₂⁻ – Radical superóxido

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económicos

ONOO⁻ – Peroxinitrito

PKG – Proteína cinase G

RNS – Radicais livres de azoto

ROS – Radicais livres de oxigénio

sCG – Guanilato ciclase solúvel

SDRA – Síndrome respiratória aguda grave

SHIM – Sexual Health Inventory for Men

SOD – Superóxido dismutase

TNF- α – Fator de necrose tumular-alfa

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Índice:

1	Introdução	12
2	Materiais e métodos	19
3	Resultados e discussão	20
3.1	Potencial terapêutico da suplementação com L-arginina e L-citrulina.....	20
3.1.1	Modelos animais de isquemia/reperfusão	20
3.1.2	Modelos humanos de isquemia/reperfusão	28
3.1.3	Exercício físico	29
3.1.4	Envelhecimento vascular	32
3.1.5	Disfunções neurológicas	35
3.1.6	Disfunção erétil.....	36
3.1.7	Fenômeno de Raynaud.....	39
3.1.8	Hipertensão	42
3.1.9	Sépsis	45
4	Conclusões	48
5	Referências Bibliográficas	49

Índice de Figuras:

Figura 1 - Estrutura química da L-arginina (desenhada com o software ChemSpider).
..... 14

Figura 2 - Estrutura química da L-citrulina (desenhada com o software ChemSpider).
..... 16

Figura 3 - Esquema proposto do mecanismo pelo qual o monóxido de azoto (NO) é produzido nas células celulares e a sua atividade na célula muscular lisa vascular, bem como o ciclo da citrulina-NO que leva a L-citrulina, um metabolito da síntese de NO via eNOS, a ser transformado em L-arginina. Primeiro, a L-citrulina é transformada em argininasuccinato pela argininasuccinato sintetase (AAS), seguindo-se a ação da argininasuccinato liase (ASL), originando a L-arginina. O metabolismo proteico também tem a capacidade de fornecer a L-arginina a este ciclo. Legenda: sGC – guanilato ciclase solúvel; GTP – guanosina trifosfato; cGMP – guanosina monofosfato cíclico; PKG – proteína cinase G..... 18

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Enzimas envolvidas no metabolismo da L-arginina e da L-citrulina, a sua localização, os substratos e os produtos resultantes..... 15

1 Introdução

A isquemia é um fenómeno fisiopatológico encontrado frequentemente em doenças cardiovasculares (DCV) como a doença isquémica cardíaca, a doença cerebrovascular e a doença vascular periférica, caracterizando os seus eventos de agudização (1,2), sendo as duas primeiras as duas principais causas de incapacidade a nível mundial (3). Estas doenças resultam de uma interação complexa entre fatores genéticos, ambientais e relacionados com o estilo de vida (4–6). Até um certo ponto, estes eventos cardiovasculares podem ser prevenidos adotando um estilo de vida saudável, nomeadamente reduzindo os hábitos etílicos e tabágicos, praticando exercício físico regularmente, controlando a pressão arterial e os níveis de colesterol total no sangue. No caso dos doentes diabéticos, adiciona-se ainda o controlo da hemoglobina glicada (HbA1c). Quando necessário deve recorrer-se a terapia médica ou farmacológica para assegurar um controlo adequado destes parâmetros (7,8). Face à constante necessidade de melhorar os esquemas farmacoterapêuticos novas alternativas farmacológicas têm sido exploradas de forma a melhorar a qualidade de vida dos doentes.

As DCV continuam a ser o maior problema de saúde a nível mundial, estando no topo das causas tanto de morbilidade como de mortalidade (9). Apesar da mortalidade relacionada com as DCV na Europa estar atualmente a diminuir (10), estimativas recentes apontam para um valor a rondar os 31% do total de mortes a nível mundial (11). Em 2016, a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económicos (OCDE) apontou um valor superior a 10% de todos os gastos em saúde que seriam aplicados nestas doenças, sendo os internamentos e os gastos com medicação as despesas maioritárias. Além disso, a despesa com as DCV na Europa subiu de 169 mil milhões de euros em 2006 para 210 mil milhões de euros em 2015, sendo a doença isquémica cardíaca e a doença cerebrovascular as que têm um maior impacto no Orçamento para a Saúde (12). A doença isquémica cardíaca é também a principal causa de mortes prematuras tanto na Europa como a nível mundial. Estima-se que no nosso continente o número de pessoas que vivem com esta doença atinja os 30 milhões (13). Nas últimas décadas o paradigma da fisiopatologia das DCV tem-se alterado. Em particular, tem vindo a ser cada vez mais reconhecido o papel central do endotélio vascular na manutenção da homeostasia cardiovascular, bem como na instalação e progressão de diversas doenças deste foro (14). As células endoteliais apresentam assim

diversas funções, entre as quais a regulação do tónus vascular, a regulação da permeabilidade vascular e da hemostase. O endotélio vascular participa na regulação do tónus vascular através da secreção de mediadores vasoativos, sendo que em condições fisiológicas a secreção de vasodilatadores predomina sobre a secreção de vasoconstritores. O principal vasodilatador endotelial é o monóxido de azoto (NO), sintetizado a partir do aminoácido da L-arginina pela enzima monóxido de azoto sintase (eNOS) (15).

A disfunção endotelial é caracterizada pela redução da vasodilatação endotelial mediada pelo NO, resultado tanto da diminuição da sua produção, como do aumento da sua degradação (16,17). Esta redução na biodisponibilidade do NO e o aumento da endotelina-1 leva a uma diminuição do lúmen vascular devido ao aumento da vasoconstrição (18). A diminuição dos níveis de NO está também associada ao aumento a adesão leucocitária, devido ao aumento da expressão de moléculas que promovem essa mesma adesão (como é o caso da proteína quimioatratadora de monócitos-1) por parte das células endoteliais (18). O tónus muscular também é afetado, e durante o exercício físico ou em situações de maior stress, pode conduzir a uma constrição das artérias coronárias em doentes com doença arterial coronária (19). Apesar de a disfunção endotelial ser um fenómeno sistémico e que afeta diferentes tipos de vasos sanguíneos, estudos recentes têm vindo a sugerir que este fenómeno se manifesta nos leitos microvasculares antes de se manifestar nos vasos de grande calibre (20). A disfunção endotelial está presente em muitas DCV (14–16,21), sendo, por isso, da máxima importância identificar novas estratégias terapêuticas que tenham como objetivo reverter esta situação (22). Considerando os efeitos nocivos da diminuição de NO, a comunidade científica tem identificado estratégias terapêuticas de modo a aumentar a sua concentração no organismo, através da administração de dadores de NO (como a nitroglicerina ou o mononitrato de isossorbida), bem como através da administração dos seus precursores, como o são a arginina e a citrulina.

A L-arginina (Figura 1) é um pó cristalino, sem odor característico, com um peso molecular de 174,2 g/mol e um coeficiente de partição octanol:água (logP) de -4,20 (32). É um aminoácido essencial que pode ser encontrado essencialmente em alimentos de origem animal, como a carne e o marisco. Também são conhecidas fontes vegetais deste aminoácido, como o amendoim, a melancia, a soja, as sementes de girassol e de sésamo, amêndoas, nozes, avelãs, grão-de-bico e lentilhas (33,34). Com o crescimento

da indústria da suplementação alimentar, têm sido explorados métodos mais eficientes para a produção de L-arginina, sendo que atualmente o método mais utilizado é a fermentação, com recurso a bactérias, como é o caso da *Corynebacterium* spp., que utiliza fontes naturais de carbono para a biossíntese deste aminoácido (35,36).

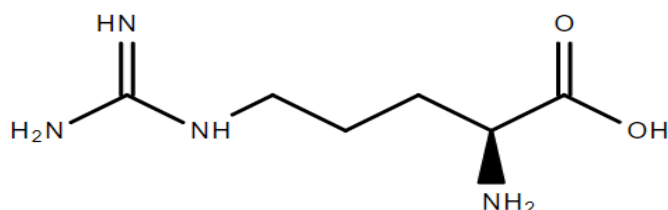


Figura 1 - Estrutura química da L-arginina (desenhada com o software ChemSpider).

Em condições fisiológicas, a L-arginina é o principal precursor do NO (37), importante para o funcionamento dos sistemas cardiovascular (38), respiratório (39) e nervoso (40). É conhecido o seu o seu envolvimento na manutenção da atividade do sistema imunitário e na secreção hormonal, bem como na produção de espermatozoides. Tem ainda capacidade de funcionar como modulador alostérico em reações de fosforilação, assim como na destoxificação da amónia, na síntese de ureia, poliaminas, agmatina e creatina (41,42). Além de ser um substrato para a produção de NO, a L-arginina também forma produtos metilados de si mesma, na presença de arginina metiltransferases, enzimas cuja atividade se apresenta aumentada na presença de radicais livres de oxigénio (ROS) e de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e que transferem grupos metilo para a L-arginina. Estes produtos metilados funcionam como inibidores das NOS, causando assim o chamado “paradoxo da L-arginina”, podendo ser um dos motivos para a ausência de resposta à suplementação com este aminoácido em determinadas situações (43).

A captação da L-arginina por parte das células ocorre por um sistema de difusão facilitada dependente do potencial de membrana, o sistema y^+ independente de Na^+ (44). Este transportador catiónico é encontrado principalmente nos fibroblastos (45) e nas células musculares lisas vasculares (46), com uma menor expressão no tecido hepático (41). Nas células endoteliais, a arginina atravessa a membrana plasmática através do transportador catiónico de aminoácidos-1 (CAT-1) que, devido à sua proximidade física, a entrega diretamente à isoforma endotelial da monóxido de azoto sintase (eNOS) (47).

Um estudo de biodisponibilidade da arginina em rato mostrou que cerca de metade da quantidade ingerida é libertada na circulação portal (41), sendo a restante convertida, nos próprios enterócitos, em L-ornitina e L-citrulina, sendo posteriormente libertados no fluido extracelular (48).

As enzimas implicadas no metabolismo da arginina (Tabela 1) podem ser classificadas em dois grupos: enzimas catabólicas (Monóxido de azoto sintase, arginase, arginina:glicina amidinotransferase e arginina descarboxilase) e enzimas sintetizadoras (argininosuccinato sintase e argininosuccinato liase, que atuam sequencialmente). A arginina deiminase não é expressa por células eucariotas animais, mas pode estar presente em agentes patogénicos, como na *Giardia lamblia* (23,49,50).

Tabela 1 - Enzimas envolvidas no metabolismo da L-arginina e da L-citrulina, a sua localização, os substratos e os produtos resultantes

Enzima(s)	Principais locais de ação	Substrato(s)	Produto(s)
Monóxido de azoto sintase	Células endoteliais, macrófagos	Arginina + O ₂	Citrulina + NO
Arginase	Tipo I (citosólica) - hepatócitos Tipo II (mitocondrial) – neurónios, nefrónio, enterócitos e macrófagos	Arginina	Ornitina + Ureia
Arginina:glicina amidinotransferase	Nefrónio, hepatócitos, células acinares, miócitos	Arginina + glicina	Ornitina + Guanidinoacetato

Arginina decarboxilase	células gliais, macrófagos e enterócitos	Arginina	Agmatina + CO ₂
Arginina deiminase	<i>Giardia lamblia</i>	Arginina	Citrulina + NH ₄ ⁺
Argininasuccinato sintetase e argininasuccinato liase	Enterócitos e nefrónio	Citrulina + ATP	Arginina

A L-citrulina (Figura 2) apresenta-se com um aspeto sólido e sem cor à temperatura ambiente, com um peso molecular de 175,2 g/mol e um coeficiente logP de -3,19 (32).

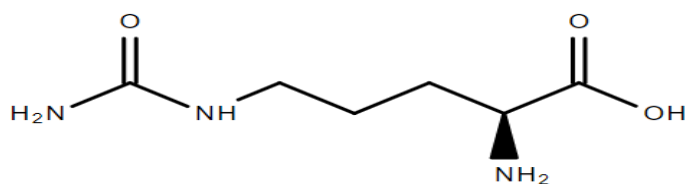


Figura 2 - Estrutura química da L-citrulina (desenhada com o software ChemSpider).

A L-citrulina é um aminoácido não essencial que foi primeiramente identificado no sumo de melancia, sendo esta atualmente a sua principal fonte natural (51,52). Pode também ser encontrado, em menor quantidade, em frutos de plantas da família *Cucurbitaceae*, como no pepino e na abóbora (51,53).

A literatura sugere que a região ótima para absorção deste aminoácido é entre o íleo médio e o íleo terminal, predominantemente por transporte ativo via canais transportadores de aminoácidos (possivelmente os transportadores ASC ou B^{0,+}) dependentes de sódio nos enterócitos (53,54), sendo libertada na circulação portal, com o seu pico de concentração plasmática a ser atingido cerca de duas horas após a ingestão oral (53).

No modelo animal mais estudado, como é o caso do rato, o fígado é o órgão principal de síntese de citrulina, ocorrendo este processo dentro das mitocôndrias. Após o seu

transporte para o citoplasma, pode tanto entrar na corrente sanguínea como ser convertida em arginina, dependendo das necessidades metabólicas (55). Isto ocorre devido à presença de níveis elevados das enzimas carbamoilo fosfato sintase e ornitina transcarbamilase, em relação a outros tecidos. A primeira é responsável pela formação do carbamoilo fosfato, que vai atuar como substrato, juntamente com a ornitina, para a formação de citrulina, por parte da ornitina transcarbamilase (56). A arginina que se forma no fígado é essencialmente transformada em ureia e ornitina (57).

A L-arginina utilizada pelas células endoteliais é obtida através de três processos diferentes: (1) captada do espaço extracelular, (2) sintetizada *de novo* pela própria célula ou (3) resultante de processos de degradação de proteínas celulares (23). Depois de obtida, a L-arginina pode ser usada por uma das três diferentes isoformas NOS - NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS), e a NOS endotelial (eNOS) (24). Estas isoformas catalisam uma reação de oxidação da qual resulta NO e o aminoácido L-citrulina, sendo a L-arginina o substrato da reação, e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), a tetrahidrobiopterina (BH₄) e oxigénio (O₂) os co-substratos (25). Paralelamente, a L-arginina intervém também no ciclo da ureia, servindo de substrato à enzima arginase na primeira reação do ciclo, da qual resulta o aminoácido L-ornitina e a ureia (26).

O NO é um gás incolor, apresentando um tempo de semivida entre os 6 e os 10 segundos *in vivo* (27). Para além de atuar como vasodilatador, o NO apresenta outras funções importantes, incluindo a regulação local do crescimento celular (19,28), a inibição da agregação plaquetária e da adesão plaquetária ao endotélio (29), e regulação e modulação do sistema imunitário, exibindo propriedades anti-inflamatórias (30). Nas células endoteliais, o cálcio intracelular atua como modulador da atividade da eNOS, sendo que o aumento da sua concentração plasmática provoca um aumento na produção de NO via eNOS. Após a sua produção na célula endotelial, o NO difunde-se para as células musculares lisas vasculares, onde vai ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) que catalisa a transformação da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que por sua vez reage com a proteína cinase G (PKG) (Figura 1). A função da PKG é fosforilar proteínas efectoras envolvidas na vasodilatação, na proliferação celular, na inibição da agregação plaquetária e na ativação de neutrófilos (31).

Em ambientes oxidativos, a biodisponibilidade de NO é consequência de um aumento de ROS, nomeadamente do radical superóxido (O_2^-). Este vai reagir com o NO livre e origina peroxinitrito ($ONOO^-$), um anião com características oxidantes e extremamente reativo, capaz de provocar lesão dos tecidos (32).

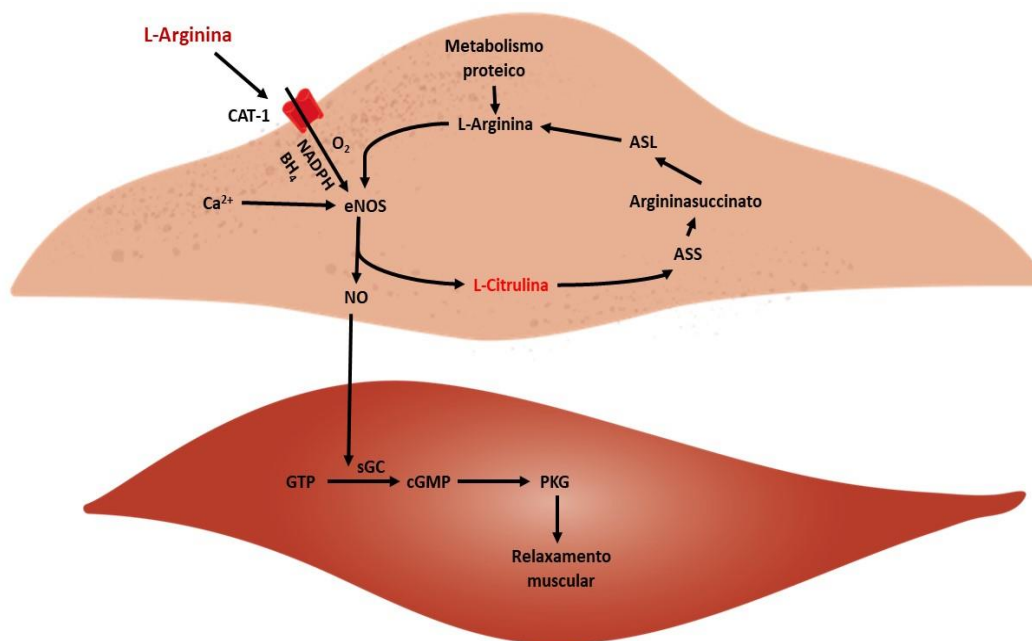


Figura 3 - Esquema proposto do mecanismo pelo qual o monóxido de azoto (NO) é produzido nas células celulares e a sua atividade na célula muscular lisa vascular, bem como o ciclo da citrulina-NO que leva a L-citrulina, um metabolito da síntese de NO via eNOS, a ser transformado em L-arginina. Primeiro, a L-citrulina é transformada em argininasuccinato pela argininasuccinato sintetase (AAS), seguindo-se a ação da argininasuccinato liase (ASL), originando a L-arginina. O metabolismo proteico também tem a capacidade de fornecer a L-arginina a este ciclo. Legenda: sGC – guanilato ciclase solúvel; GTP – guanosina trifosfato; cGMP – guanosina monofosfato cíclico; PKG – proteína cinase G

Assim, pretende-se com esta revisão de literatura abordar as potencialidades terapêuticas dos aminoácidos arginina e citrulina numa série de DCV, bem como em patologias cujo endotélio vascular e a microcirculação esteja ligado ao mecanismo de patogénese, nomeadamente no envelhecimento vascular, nas disfunções neurológicas, na disfunção erétil, no fenómeno de Raynaud, na hipertensão, na sépsis e em modelos de isquémia/reperfusão. Também será explorada a sua utilidade como suplementação na prática de exercício físico.

2 Materiais e métodos

Para esta revisão de literatura, a informação foi obtida através da pesquisa em bases de dados eletrónicas, nomeadamente no *PubMed* e no *Google Scholar*, tendo sido seleccionados apenas textos em inglês, com exceção de duas publicações de língua portuguesa referentes a informações epidemiológicas nacionais. Na pesquisa inicial, foram considerados estudos a partir do ano 2000, sendo posteriormente alargada indefinidamente de forma a completar a informação desta revisão. De entre as DCV, foram seleccionadas as patologias onde o envolvimento endotelial fosse mais evidente, e cujo benefício da suplementação com dadores de NO fosse uma possibilidade. Foram então seleccionadas como palavras-chave *arginine*, *citrulline*, *nitric oxide*, *vascular ageing*, *vascular dementia*, *erectile dysfunction*, *Raynaud phenomenon*, *hypertension*, *sepsis* e *physical exercise*. A pesquisa foi então iniciada, começando pela pesquisa de informação relativa às doenças cardiovasculares e do envolvimento do endotélio nas mesmas, bem como das funções do NO. De seguida foram pesquisados estudos em animais que envolvessem a suplementação com L-arginina ou L-citrulina dentro dos temas supramencionados, utilizando como palavras-chave *arginine*, *citrulline*, *ischemia-reperfusion*, *oxidative stress*. O mesmo método foi utilizado na fase seguinte, quando foram pesquisados estudos, desta vez em humanos. Os estudos presentes neste trabalho foram seleccionados com base na presença de parâmetros cardiovasculares laboratoriais e/ou clínicos que apoiassem, ou não, a utilização destes dois aminoácidos no contexto em estudo.

3 Resultados e discussão

3.1 Potencial terapêutico da suplementação com L-arginina e L-citrulina

3.1.1 Modelos animais de isquemia/reperfusão

A lesão orgânica por isquemia-reperfusão (I/R) é encontrada em DCV caracterizadas por oclusões vasculares agudas (ex, acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio, isquemia do membro inferior) acompanhadas das respectivas estratégias de reperfusão (ex. terapia trombolítica, angioplastia, reconstrução cirúrgica), bem como em alguns procedimentos cirúrgicos de rotina. é induzida experimentalmente com o objetivo de tentar mimetizar a fisiopatologia de algumas doenças caracterizadas. Esta lesão é iniciada pela isquemia propriamente dita, caracterizada pelo suprimento deficiente de oxigênio aos tecidos, seguindo-se a reperfusão que, apesar de normalizar a entrega daquele gás, também amplifica a lesão. A lesão por I/R pode ser induzida experimentalmente em modelos animais com o intuito de mimetizar a fisiopatologia de diversas doenças, bem como de avaliar a eficácia de estratégias terapêuticas.

3.1.1.1 Modelo cardíaco

A lesão miocárdica provocada por I/R é resultado da sobreprodução de ROS, da sobrecarga de cálcio no meio intracelular, bem como dos efeitos prejudiciais causados pela ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona, das plaquetas e do sistema complemento. Dependendo da duração e gravidade da lesão, poderá ocorrer a morte dos cardiomiócitos. A arritmia de reperfusão e a disfunção endotelial são as consequências mais frequentes deste tipo de lesões. (58).

O efeito da L-arginina após o período de I/R induzida foi estudado no coração de ratos e no de porcos sujeitos a transplante de coração e oclusão de artérias coronárias, respetivamente (59,60). Num dos primeiros estudos realizados em ratos a propósito desta temática, a L-arginina (40 mg/kg) foi administrada 5 minutos antes da reperfusão durante um período de 20 minutos. Após 60 minutos de reperfusão, foi observada uma melhor recuperação da função sistólica, do relaxamento miocárdico e um maior fluxo sanguíneo miocárdico no grupo tratado com L-arginina, quando comparado com o grupo de controlo, mostrando assim o seu benefício na recuperação de eventos isquémicos cardíacos. Além disso, a vasodilatação dependente do endotélio foi

melhorada 24 horas após o procedimento, após a administração de acetilcolina (59). Estes efeitos protetores do miocárdio foram também observados em porcos Yorkshire quando perfundidos com 4 mg/kg/min durante os 10 minutos (um total de 40 mg/kg) antes da oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda. Além disso, a administração de L-arginina impediu a diminuição dos níveis de NO induzido pela isquemia e reduziu os níveis de malonaldeído (marcador da peroxidação lipídica resultante da ação de radicais livres) e de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intracelular solúvel-1, a molécula de adesão leucocitária endotelial-1, e molécula de adesão de células vasculares-1 (60).

O aumento da síntese de NO através da suplementação com L-arginina parece desempenhar um papel importante na proteção do miocárdio contra a lesão causada por I/R em ambos os modelos animais, através da redução do stress oxidativo, da eliminação dos radicais superóxido e impedindo a reação em cadeia dos radicais livres dentro da membrana lipídica, confirmado pela diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios, dos produtos de oxidação lipídica, da expressão das moléculas de adesão e das interações neutrófilo-endotélio. Este aumento da síntese de NO pode ser explicado por dois mecanismos: (1) pelo aumento da concentração do substrato da eNOS e (2) pela preservação da atividade da própria eNOS (59,60).

3.1.1.2 Modelo pancreático

A indução de I/R no pâncreas provoca uma redução da densidade funcional capilar, uma resposta inflamatória que leva a um aumento de leucócitos aderentes nas vénulas pós-capilares, um aumento da atividade da lipase sérica, e alterações histológicas e anatômicas do próprio órgão (61). A vasoconstrição, a formação de ROS, a coagulação intravascular, e a libertação de citocinas pró-inflamatórias são os mecanismos envolvidos nas lesões do tecido pancreático (62). Em porcos, o aumento dos níveis de NO melhorou a resposta dos tecidos à lesão I/R, observando-se um efeito protetor (63).

Obermeier et al. investigaram o papel da L-arginina na microcirculação pancreática, através administração intravenosa de um total de 400 mg/kg (metade antes da reperfusão e metade depois da reperfusão) e da indução de I/R num segmento isolado da cauda pancreática de ratos Wistar *in situ*. Foi observado um efeito importante na restauração da densidade funcional capilar e na diminuição da aderência de leucócitos nas vénulas pós-capilares (64).

Mais tarde, *Dikman et al.* utilizaram os mesmos modelos animais para investigar os efeitos da L-arginina na atividade da heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima que protege as células em ambientes oxidativos. Sabe-se que tem efeitos citoprotetores, anti-inflamatórios, anti-proliferativos, e anti-apoptóticos, inibe a adesão de leucócitos às células endoteliais e reduz a ativação dos mesmos. Pensa-se que a L-arginina está envolvida na sua regulação (65,66). Uma dose de 400 mg/kg demonstrou ser eficaz na diminuição dos níveis de marcadores inflamatórios [amilase, mieloperoxidase (MPO), superóxido dismutase (SOD), malondialdeído (MDA)] após isquemia induzida, associado a um aumento da expressão de HO-1 (66).

Uma dose total de 400 mg/kg de L-arginina administrada por via intravenosa mostra ter um efeito protetor nas lesões induzidas por I/R, através da redução da adesão leucocitária nos vasos e manutenção da densidade capilar funcional (64,66). Estes efeitos parecem ser obtidos pela modulação de canais iônicos através da cGMP, após ativação da sGC (64). Além disso, a HO-1 desempenha um papel importante na proteção do pâncreas contra o stress oxidativo, que pode ser modulável pela administração de L-arginina (66). Novos estudos devem ser realizados para avaliar os efeitos desta suplementação para outras vias de administração, bem como estudos que explorem a possibilidade de se utilizar a L-citrulina.

3.1.1.3 Modelo hepático

Foram realizados estudos em modelos animais de esteatose hepática de forma a perceber o papel do NO na microcirculação hepática e na oxigenação de tecidos (67,68). Em situações patológicas sabe-se que a microcirculação se encontra deteriorada (69). Uma única dose de 300 mg/kg de L-arginina provou ter efeitos benéficos na microcirculação de fígados gordos, bem como melhorar o fluxo sanguíneo hepático tanto a nível arterial como venoso. A oxigenação hepática e os índices de oxigenação intracelular do órgão também foram melhorados. (68). Do mesmo modo, a administração intravenosa de concentrações crescentes de L-arginina (50, 100, 300 e 500 mg/kg) também mostrou um efeito positivo na microcirculação hepática e na oxigenação tecidual (67). Apesar deste importante efeito protetor, a L-arginina não teve qualquer efeito sobre a pressão arterial (67,70,71).

Durante a isquemia, a perda de equilíbrio entre o NO e a endotelina-1 induz a vasoconstrição e o estreitamento do lúmen dos sinusoides hepáticos, comprometendo o

fluxo dos leucócitos e provocando o seu contacto com a parede capilar, o que pode levar à sua adesão ao endotélio. A agregação plaquetária é outra das consequências desta constrição (72,73). *Shiraishi et al.* estudaram o efeito da administração portal de L-arginina (300 mg/kg) durante a isquémia no metabolismo da L-arginina em ratos machos adultos Wistar. No grupo suplementado com L-arginina, encontraram um aumento significativo de NO intra-hepático imediatamente após a reperfusão e um fluxo sanguíneo hepático melhorado ao mesmo tempo. Esta produção excessiva de NO é também confirmada pela elevação do cGMP hepático 30 minutos após a reperfusão. (74). *Uhlmann et al.* usaram ratos Wistar fêmeas para tentar perceber a forma como a L-arginina protege a microcirculação hepática. Uma dose de 200 mg/kg foi administrada por via intravenosa antes e depois da isquémia. Foi observado que os diâmetros das vénulas sinusoidais e pós-sinusoidais foram mantidos 30 minutos após a reperfusão, em vez de serem reduzidos conforme observado no grupo de controlo. Além disso, o número de leucócitos aderentes em sinusóides e vénulas também diminuiu, juntamente com um aumento na taxa de perfusão (71). Em ambos os casos, o aumento da produção de NO e o seu efeito vasodilatador pareceram ser a razão por detrás destes resultados.

Verificou-se que o pré-tratamento com 400 mg/kg de L-arginina administrado via intraperitoneal tinha também um efeito protetor de lesões hepáticas, tendo reduzido os marcadores de lesão hepática e as enzimas envolvidas no stress oxidativo, tais como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), peróxidos lipídicos, e grupos tiol, e aumentou a expressão da enzima de proteção contra a lesão oxidativa HO-1. A expressão de iNOS foi atenuada quando comparada com o grupo de controlo (75). O pré-tratamento com 150 mg/kg de L-arginina também provou ser eficaz na redução da atividade das enzimas hepatobiliares (ALT, AST e fosfatase alcalina), reduzindo os níveis de MDA e aumentando os níveis de glutathione (GSH) (antioxidante endógeno), catalase e a expressão de eNOS após I/R (76). Ambos os estudos sugerem que a iNOS está envolvida em situações patológicas ao interagir com anião superóxido, produzindo anião peroxinitrito, um potente oxidante com efeito citotóxico. A supressão da iNOS parece ser um dos mecanismos pelos quais a HO-1 exerce o seu efeito protetor (75,76). Além disso, o NO produzido pela eNOS parece exercer os seus efeitos protetores através de vasodilatação e mecanismo antioxidante (75).

O TNF- α , interleucinas 1 e 6, prostaglandinas e ROS, especialmente o superóxido e o peróxido de hidrogénio, são as moléculas mais frequentemente envolvidas nas lesões hepáticas por I/R (73). A L-arginina parece ter efeitos positivos na microcirculação hepática, não só pelo aumento da produção de NO, mas também pelo seu efeito protetor contra o stress oxidativo. A L-arginina também é conhecida por suprimir a elevação dos níveis plasmáticos de AST (74) e ALT após isquémia hepática (71), enzimas que aparecem aumentadas nos casos de lesões hepatocelulares. A L-arginina diminuiu ainda as citocinas inflamatórias (TNF- α e NF- κ B) e aumentou o fator anti-apoptótico Bcl-2 em ratos Wistar administrado com 150 mg/kg intraperitoneal (76).

Apesar do efeito protetor na lesão hepatocelular confirmado pela diminuição dos níveis de AST e ALT e um aumento dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), NO e cGMP hepático, uma dose de 100 mg/kg administrada por via intravenosa antes da I/R não conseguiu melhorar a microcirculação 2 horas após a reperfusão (77). O facto do nitro L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não específico das NOS, agravar a microcirculação e a lesão hepatocelular sugere que o NO pode ter um papel importante neste efeito protetor (68,77). O motivo que pode explicar a incapacidade da L-arginina em melhorar a microcirculação neste caso pode residir na dose, visto que anteriormente foram citados estudos semelhantes, mas com uma dose de suplementação superior, pelo que podemos presumir que este efeito pode ser dose-dependente no caso destes modelos, sendo necessários estudos específicos para comprovar esta teoria.

3.1.1.4 Modelo de retalhos cutâneos

A diabetes mellitus (DM) tipo 1 e tipo 2 tem sido associada ao desenvolvimento de disfunção endotelial que pode evoluir para disfunção orgânica (78). Nos modelos de ratos de DM, foram administrados 50 mg/kg de L-arginina por via intravenosa 30 minutos antes da indução da isquémia. Em ambos os casos, a taxa de vitalidade dos retalhos cutâneos foi significativamente aumentada quando a L-arginina foi administrada (79,80). Nos modelos de retalhos cutâneos, o iNOS, eNOS ou nNOS foram capazes de melhorar a taxa de vitalidade dos mesmos, com a eNOS mostrando-se mais eficaz, seguido da iNOS e da nNOS, embora em DM tipo 2 níveis mais elevados destas três isoformas não signifiquem uma taxa de vitalidade mais elevada (79,80). No caso da iNOS, esta evidência vai contra o que foi observado nos modelos hepáticos de I/R, onde níveis elevados desta isoforma foram associados a lesões hepatocelulares (75,76). Embora o NO pareça ter um efeito protetor contra lesões I/R, as concentrações

excessivas desta molécula estão associadas a efeitos adversos pró-oxidantes, que podem levar a disfunção vascular por inflamação, disfunção endotelial, e peroxidação lipídica (79). Em situações inflamatórias onde a iNOS se encontra aumentada, a produção de NO por esta isoforma pode ser até 1000 vezes superior em relação ao NO produzido pela eNOS (81).

Anteriormente, *Cordeiro et al.* estudaram o efeito da administração intraperitoneal de L-arginina (300 mg/kg) na viabilidade do retalho cutâneo após I/R. A área necrosada e a contagem de neutrófilos após a reperfusão foram mais baixas quando comparados com o grupo de controlo e o grupo administrado com L-NAME. Estes resultados sustentam a teoria de que os neutrófilos podem provocar uma lesão do tecido nos modelos I/R, e que um doador NO pode ser benéfico na proteção contra lesões induzidas I/R através do aumento da produção de NO, inibindo a adesão dos neutrófilos ao endotélio e consequentemente a lesão mediada pelas células (82).

3.1.1.5 Modelo gástrico

O efeito gastroprotetor da L-arginina e L-citrulina foi também estudado em modelos de I/R. Sabe-se que a I/R gástrica pode ser avaliada por marcadores histológicos e pela expressão de moléculas como a GSH e a MPO. À semelhança de outros sistemas, a I/R gástrica leva à peroxidação lipídica, produção de radicais livres de oxigénio por parte das células endoteliais, e estimulação do metabolismo oxidativo (83,84). O NO derivado da iNOS é um dos responsáveis pela infiltração/ativação de neutrófilos na mucosa gástrica e interage com radicais superóxidos para produzir aniões peroxinitrito (85).

Em todas as doses testadas de L-citrulina (300, 600 e 900 mg/kg) administradas através da ração 60 minutos antes da experiência, foi observado um efeito protetor da lesão da mucosa gástrica de uma forma dose dependente, confirmado pela diminuição da atividade da MPO e do nível de MDA na mucosa gástrica. A ausência destes efeitos quando foi administrada simultaneamente a L-citrulina e a L-NAME parece confirmar a dependência de NO para o efeito protetor (85). Além de estudar os efeitos da L-citrulina, utilizando as mesmas doses e via de administração, *Gou et al.* também estudaram os efeitos da L-arginina (300 mg/kg administrada intraperitonealmente 30 minutos antes da experiência) como dador de NO. Como esperado, ambos os aminoácidos tiveram efeitos positivos, inibindo lesões graves induzidas pela I/R. A L-

citrulina foi também capaz de reduzir os níveis de atividade da MDA e MPO gástrica, atenuando o aumento da expressão da iNOS, com um ligeiro aumento da expressão da nNOS e eNOS na mucosa gástrica e preservando a síntese e secreção da mucosa gástrica, evitando a diminuição de hexosamina (marcador da síntese de muco gástrico) (86).

Os efeitos observados nos grupos suplementados com L-citrulina são conseguidos impedindo a diminuição do nível de muco da mucosa gástrica, sendo o NO produzido pelas nNOS e eNOS os agentes responsáveis. Além disso, a supressão da atividade da iNOS é outro mecanismo pelo qual a L-citrulina reduz as lesões induzidas pela I/R gástrica (85,86). Foi também provado que o NO inibe a infiltração e ativação dos neutrófilos, previne o aumento dos níveis de MDA gástrico e da atividade da MPO, prevenindo danos oxidativos, numa dose dependente de L-citrulina (86,87).

3.1.1.6 Modelo Intestinal

A L-arginina (10 mg/kg) administrada por via intravenosa 5 minutos antes da reperfusão parece ser capaz de restaurar a resposta contrátil induzida pela acetilcolina, diminuir a peroxidação lipídica (diminuição do marcador MDA), e aumentar o conteúdo de GSH após a indução de I/R, reduzindo significativamente a lesão da mucosa no ílio (88). Anteriormente, *Sukhotnik et al.* já tinham descrito o efeito protetor da administração crónica de L-arginina (administrada em água (2%) 48 h antes e após I/R), observando-se a manutenção do peso jejunal, duodenal e ileal, e do índice de proliferação das células ileais e jejunais, melhorando a recuperação da mucosa após lesão por I/R, quando comparada com o grupo de controlo (89). Este efeito protetor parece estar relacionado com uma melhor libertação de NO do endotélio vascular, com a inibição do anião superóxido e uma menor ativação dos neutrófilos. Além disso, a L-arginina aumentou a produção de GSH, que tem a capacidade de reagir com os radicais livres, eliminando-os, fornecendo proteção contra os radicais de oxigénio e hidroxilo (88–90). A infusão prévia de L-arginina (4 mg/kg/min) por via intravenosa também mostrou um melhor resultado quando comparada com a administração oral e intraluminal, inibindo as lesões das mucosas e a infiltração de neutrófilos (91).

Numa outra experiência, *Lai et al.* estudaram o efeito de ambos os aminoácidos na prevenção da inflamação e dos danos ao nível do jejuno. A L-citrulina (1 g/kg/dia) atenuou o aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α tanto a nível plasmático como nas

células desta porção intestinais. As observações histológicas mostraram que no grupo suplementado com citrulina existiam menos alterações. Tanto o iNOS como o eNOS não foram significativamente afetados por estes aminoácidos (92). A ausência de resposta parece estar relacionada com a dose. A suplementação com L-citrulina (aparentemente através do aumento da biodisponibilidade plasmática de arginina) provou ser capaz de combater estes desequilíbrios, sendo capaz de melhorar a recuperação intestinal após I/R (93).

3.1.1.7 Modelo renal

Foi observado que a L-arginina tinha a capacidade de proteger tanto os rins como a bexiga de lesões induzidas por I/R, mostrando ter um efeito positivo na taxa de filtração glomerular (GFR) e na função tubular após isquemia (94,95), atenuando a elevação da creatinina sérica e reduzindo a incidência de alterações histopatológicas (95–97), tendo sido observado os mesmos efeitos protetores quando foi utilizada a L-citrulina (98). Este efeito protetor é ainda apoiado por um aumento da atividade enzimática da GSH, CAT, SOD e GPx (95,97,98). O desequilíbrio entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante, incluindo as enzimas GPx e CAT, leva ao aumento da oxidação de macromoléculas celulares (95).

Também se verificou um aumento na produção de NO tanto com a administração de L-arginina (94,97) como de L-citrulina (98). Estes aminoácidos parecem ter um papel importante na prevenção de lesões provocadas por I/R ao (1) proteger os tecidos usando a sua ação vasodilatadora, (2) prevenir a reação em cadeia que leva à produção de ROS (97) e (3) diminuir a adesão de leucócitos e a infiltração de neutrófilos durante a I/R do tecido (99).

Os níveis de MDA foram diminuídos com a suplementação com ambos os aminoácidos (95,98). O pré-tratamento com L-citrulina foi também capaz de atenuar a diminuição da expressão da enzima eNOS, induzida pela I/R, verificando-se também uma diminuição da expressão de iNOS (98). O NO derivado da eNOS tem um efeito protetor contra lesões teciduais (100), enquanto que o NO gerado pela iNOS reage com o anião superóxido para formar peroxinitrito (101). Portanto, pensa-se que a inibição da expressão ou atividade da iNOS reduz a lesão renal provocada por fenómenos de I/R. O pré-tratamento com L-NAME agravou a lesão renal (94,95,98), validando a capacidade que o NO tem na proteção dos rins da lesão por I/R.

3.1.1.8 Modelos de outros órgãos

A administração intravenosa de 300 mg/kg de L-arginina antes da reperfusão após isquemia induzida unilateral dos membros posteriores provou ser eficaz no aumento da produção de NO e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), diminuindo a lesão muscular induzida por I/R (102). No encéfalo, a administração oral de 100 mg/kg de L-citrulina durante 10 dias após a oclusão bilateral da artéria carótida comum tinha mostrou um efeito neuroprotetor contra a morte de células neuronais e impediu a diminuição da expressão de eNOS e o aumento da expressão de nNOS, sem exibir efeitos na expressão de iNOS (103).

3.1.2 Modelos humanos de isquemia/reperfusão

Embora em menor número, os efeitos da suplementação com estes dois aminoácidos também foram estudados nos humanos. Em média, a dieta diária de uma pessoa com uma alimentação equilibrada contém 5,4 g de L-arginina, sendo que apenas cerca de 30 a 50% entram na corrente sanguínea (104). Sendo um substrato para a síntese de NO, é natural que a suplementação com L-arginina fosse colocada como uma opção viável à manutenção das competências endoteliais, bem como do bom funcionamento da microcirculação. Também estão descritas outras atividades da L-arginina independentes do NO, como a diminuição da atividade da enzima de conversão da angiotensina, diminuição da viscosidade do sangue, regulação do pH intra e extracelular ou a síntese de ureia e creatinina (43).

Um dos primeiros estudos foi realizado em 16 indivíduos saudáveis, induzindo a isquemia no antebraço (oclusão arterial a 200 mmHg) durante 20 minutos, seguida de 60 minutos de reperfusão. A L-arginina (20 mg/min) foi administrada através de infusão na artéria braquial durante 15 minutos, com início ao décimo quinto minuto de isquemia. A recuperação da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio durante a reperfusão foi significativamente superior no grupo suplementado com L-arginina em relação ao grupo de controle, mostrando assim a sua capacidade *in vivo* de proteção contra a disfunção endotelial (105). Utilizando o mesmo protocolo mas com uma população diferente (indivíduos com DM tipo 2 e doença arterial coronária), foram obtidos resultados semelhantes quanto ao benefício deste aminoácido (106).

Também foi estudada a suplementação com arginina em pacientes submetidos a reconstrução mamária, cujo procedimento envolveu a inserção de um retalho cutâneo

retirado de outra parte do corpo. A principal causa de rejeição destes retalhos é a incapacidade vascular em perfundir toda a sua área, principalmente ao nível da microcirculação, somado à lesão causada aquando da reperfusão. Neste contexto, os pacientes receberam suplementação intravenosa de L-arginina (30 g/dia) durante os 5 dias após o procedimento. Ao longo destes 5 dias, foi observado que neste grupo uma melhor perfusão do retalho em relação ao grupo de controlo, suplementado com alanina, com um aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação (107).

Sendo um precursor da L-arginina, a L-citrulina também tem potencial na terapêutica destas patologias e na sua prevenção. Para tal, foi estudado o efeito da sua suplementação (6 g juntamente com sumo de beterraba, 90 minutos antes da indução da isquémia) em indivíduos saudáveis sujeitos a oclusão do membro inferior entre 3 e 6 minutos (dependente da taxa de oxigenação dos tecidos), seguidos de 5 minutos de reperfusão em que foram recolhidos dados por espectroscopia de infravermelho próxima. No grupo suplementado com L-citrulina, foi observado um aumento na concentração total de hemoglobina e de oxihemoglobina tanto a nível do gêmeo como a nível da coxa, quando comparado com o grupo de controlo. Estes resultados sugerem um aumento na vasodilatação pós isquémica, possivelmente pelo aumento de produção de NO via L-arginina-NOS (108).

Estudos anteriores demonstraram que o estudo da função endotelial no antebraço é um modelo com uma boa correlação com as artérias coronárias (105), pelo que a suplementação com L-arginina tem potencial na recuperação de doentes com patologia coronária isquémica. Contudo, são necessários ensaios clínicos de maior dimensão para estabelecer o seu uso nas terapêuticas das DCV, principalmente pelo facto de a maioria dos participantes nestes estudos serem pessoas saudáveis que foram sujeitas a uma isquémia induzida, uma realidade diferente daquela que os doentes com estas patologias vivem.

3.1.3 Exercício físico

A prática regular de exercício físico está indicada na adoção de um estilo de vida saudável. De entre os diversos benefícios para a saúde, destacam-se o aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, redução da pressão arterial e melhorias no sistema antioxidante celular do próprio organismo, nomeadamente a diminuição do stress oxidativo apoiado pela diminuição da

peroxidação lipídica, aumento da atividade de enzimas anti oxidantes, como a catalase, a SOD, a GPx, a glutathione redutase (109–111), o que diminui o risco de síndrome metabólico.

Em resposta ao exercício, as arteríolas que perfundem o músculo esquelético dilatam de forma a aumentar o fornecimento de oxigênio e nutrientes, sendo o NO, produzido pelo endotélio, a molécula responsável por este processo (112,113). Além do NO, o sistema nervoso autónomo também tem um papel fundamental na fisiologia do exercício, ao libertar catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que vão acelerar o ritmo cardíaco, bem como redirecionar o sangue para os locais com maior dispêndio energético, como os músculos e o cérebro, através de fenómenos de vasoconstrição e de vasodilatação (114). O sistema endócrino também intervém nestes fenómenos, com a libertação de hormonas tanto durante (como a aldosterona e a hormona antidiurética) como após (como a hormona do crescimento) o exercício (115).

Este aumento na produção de NO é suportado por dados que reportam um aumento da excreção urinária de nitratos e um aumento dos níveis de cGMP plasmático nas duas horas subsequentes ao fim do exercício (113). O NO e a sua função como reguladora do fluxo sanguíneo têm uma importância maior durante treinos em que se usa algum tipo de resistência (p.e. nos treinos de musculação), quando comparados com treinos mais longos, de endurance, sendo o seu efeito na recuperação dos mesmos ainda desconhecida (116). Nos doentes com patologias cardiorrespiratórias, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e a Insuficiência Cardíaca Congestiva (ICC) a redução de produção de NO e conseqüente disfunção endotelial é um dos principais fatores limitantes da atividade física para esta população (117), bem como as condições inerentes às doenças supra mencionadas, como o grau de disfunção sistólica e/ou diastólica no contexto da ICC ou a diminuição da ventilação alveolar em doentes como COPD (118).

O exercício de alta intensidade promove a acumulação de amónia no sangue e o aumento da atividade catalítica da enzima fosfofrutocinase, responsável pelo aumento da glicólise. O aumento da glicólise anaeróbia neste tipo de exercício, em virtude de uma captação insuficiente de oxigênio, leva por sua vez ao aumento e acumulação de lactato, que contribui para o aumento dos níveis de fadiga (119,120). O aumento do metabolismo neste tipo de treinos, principalmente no músculo esquelético, promove também a formação de ROS por parte da mitocôndria, diminuindo assim a performance

do atleta e acelerando o processo de fadiga (109,120). Por outro lado, o aumento dos níveis de amónia também contribui para o desenvolvimento de fadiga, a nível do sistema nervoso central (117). Em situações de exercício com maiores necessidades energéticas (mais exigentes), o fígado não tem capacidade de metabolizar toda a amónia que é produzida no músculo para a obtenção de energia. Ao passar a barreira hematoencefálica, a amónia vai interagir com os astrócitos, e é incorporada no aminoácido glutamina, que em quantidades excessivas, é neurotóxico. Além deste facto, a amónia pode ainda prejudicar o bom funcionamento dos neurónios, provocando alterações a nível motor e cognitivo durante o exercício, sendo estes sintomas mais exacerbados quanto mais intenso e duradouro for o exercício (121).

A citrulina é muitas vezes utilizado por atletas como suplemento alimentar com o objetivo de melhorar o desempenho e a posterior recuperação, já tendo sido comprovada a sua capacidade de melhorar a performance no que diz respeito ao trabalho anaeróbico, através do aumento do metabolismo do ciclo da ureia com o conseqüente aumento na utilização aeróbica do piruvato, reduzindo assim a produção de lactato pela via anaeróbica. A suplementação com citrulina também mostrou ser capaz de aumentar as concentrações plasmática de arginina (119).

O efeito da suplementação com L-citrulina foi estudado numa população de idade mais avançada, com o intuito de perceber o seu efeito no fluxo sanguíneo durante o exercício. O estudo contou com 25 indivíduos sem diagnóstico de doenças cardiovasculares, doenças pulmonares e sem estarem sob efeito de medicação anti-hipertensora e anti-dislipidémica. Estes participantes foram sujeitos a suplementação com L-citrulina (6 g/dia) ou placebo (maltodextrina) durante 14 dias, sendo as medições do fluxo sanguíneo efetuadas com recurso a um Doppler de ultrassons na artéria femoral. Esta suplementação resultou num aumento de cerca de 30% da concentração plasmática de arginina. Na população masculina, a L-citrulina conseguiu um fluxo sanguíneo muscular significativamente superior ao grupo de controlo, bem como uma redução da pressão arterial diastólica. Contudo, estes efeitos são dependentes da pressão arterial em repouso, sugerindo que esta suplementação tem um efeito maior em indivíduos com algum grau de disfunção vascular (122).

Apesar de controversos, os resultados dos estudos realizados com recurso a suplementação com arginina parecem ser positivos, sendo que a disparidade de resultados parece estar relacionada com o tipo de atividade desportiva, entre os esforços

predominantemente aeróbicos ou anaeróbicos. Os diversos estudos sugerem um maior benefício nos esforços aeróbicos, de resistência, como aquele que é produzido em corridas longas ou no ciclismo. Embora menor, também foi observado um benefício nesta suplementação em esforços anaeróbicos do tipo “explosivo”. Para ambos os esforços, foi estabelecido um valor de 0,15 g/kg de peso corporal como a dose ideal a ingerir entre 60 e 90 minutos antes do esforço. Como suplementação crônica foram também estabelecidos valores de referência para melhorar a performance nestes dois esforços: entre 1,5 e 2 g/dia durante 4 a 7 semanas para esforços aeróbicos e entre 10 e 12 gramas por dia durante 8 semanas para esforços anaeróbicos (123).

Estes resultados podem ser resultado do aumento da biodisponibilidade de NO, que através da suplementação com estes dois aminoácidos, reduz a utilização de oxigênio em esforços de intensidade moderada, mais constante, e aumentando o tempo até à exaustão em exercícios de elevada intensidade (124).

3.1.4 Envelhecimento vascular

Vários estudos demonstraram que a vasodilatação dependente do endotélio é progressivamente perdida ao longo da vida, enquanto que a reatividade do endotélio a agentes vasoconstritores aumenta. Esta função endotelial é avaliada através da determinação de variações no fluxo sanguíneo ou do diâmetro arterial em resposta a estímulos provocatórios do endotélio, sendo que o método mais utilizado é o da oclusão arterial recorrendo à aplicação de uma pressão suprasistólica durante um determinado período de tempo, realizado nos membros inferiores ou superiores. Após a oclusão, estes parâmetros físicos são recolhidos através de métodos não invasivos, como as sonografias, onde se inclui o eco-Doppler, ou recorrendo a transdutores de sinal (125–127).

Com o declínio da idade, a expressão e atividade da eNOS diminui, levando a uma diminuição da produção de NO (128), havendo vários mecanismos que o explicam. Uma explicação possível é a diminuição da secreção de fatores de crescimento e hormonas, como os estrogénios, que têm um efeito positivo sobre a expressão da enzima, e com o envelhecimento a sua secreção vai gradualmente sendo suprimida (125). Por outro lado, vários autores observaram um aumento da expressão da eNOS ao longo do processo de envelhecimento em modelos animais (129,130). Isto pode ser explicado pela diminuição de NO livre, levando a um aumento da enzima de modo a

repor os níveis normais de NO (129). Esta redução na biodisponibilidade de NO relacionada com o envelhecimento está também associada a uma diminuição do seu substrato (L-arginina) (131). Com o aumento do stress oxidativo resultante do envelhecimento vascular, peroxinitrito formado a partir da reação entre o NO e as ROS vai reagir com a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) mitocondrial, provocando a sua nitrotirosilação e conseqüente inibição. Visto que os níveis de peroxinitrito e de MnSOD se apresentam aumentados em indivíduos envelhecidos, podem ambos ser úteis como marcadores do envelhecimento endotelial (129).

A formação de radicais livres é aumentada em idades mais avançadas tanto pela diminuição da competência dos sistemas antioxidantes, com a diminuição das enzimas responsáveis pela remoção destes radicais, como a SOD, como pelo aumento da expressão da enzima NADPH oxidase, cuja expressão está aumentada nos processos de envelhecimento, e representa a maior fonte do radical superóxido tanto no endotélio como nas células do músculo liso dos vasos (128). As células endoteliais em senescência expressam também moléculas de adesão, promovendo a adesão e infiltração de neutrófilos e conseqüente inflamação, acelerando o processo de aterosclerose (132)

O encurtamento dos telómeros parece ter também um papel importante no envelhecimento endotelial. Durante as sucessivas replicações do DNA, as regiões terminais dos cromossomas não são completamente duplicados, resultando num sucessivo encurtamento dos telómeros em cada ciclo, até ao ponto em que este encurtamento pode desencadear a senescência da célula (133). O encurtamento dos telómeros parece aumentar a expressão de agentes pró-inflamatórios e reduzir a atividade da eNOS em humanos (134), apoiando esta mesma teoria.

Em células endoteliais humanas das veias umbilicais (HUVECs), incubadas com uma molécula dadora de NO (S-nitrosopenicilamina), foi estudado o efeito do NO no início da senescência das células endoteliais, tendo sido reportado a inibição da senescência das células presentes nesta cultura. O mecanismo exato do modo de ação do NO sobre as telomerasas ainda é desconhecido, contudo pensa-se que a ativação de mecanismos transcripcionais ou pós-transcripcionais seja importante; por outro lado a redução do stress oxidativo a que as células estão sujeitas parece estar também envolvido (132). Estudos mais recentes sugerem que o NO possa ser um mediador epigenético do

desenvolvimento vascular, sendo que este apenas começa a ser produzido quando a tensão de cisalhamento exercida pelo sangue nas paredes vascular seja suficientemente elevada (135).

Em 2007, foi realizado um estudo em 10 indivíduos fumadores, saudáveis, entre os 23 e os 25 anos para estudar o efeito da suplementação oral com arginina nos dias 0, 1 e 3 do estudo sobre a função endotelial (dose compreendida entre os 6 e os 7 g/dia, não sendo possível definir devido a incongruências do texto publicado). Apesar do estudo ser de curto termo, foi possível observar um efeito benéfico da suplementação sobre o endotélio, espelhado pelo aumento da dilatação mediada pelo fluxo ao fim de 2 dias e pela redução progressiva do índice de rigidez da artéria aorta, indicando que a arginina tem a capacidade de proteger o endotélio dos efeitos nefastos do tabaco a curto prazo, preservando a elasticidade arterial nesta população (126). Noutro estudo mais longo, 12 indivíduos sem morbilidades com idades superiores a 70 anos foram suplementados com arginina durante 14 dias, tendo sido obtidos resultados positivos semelhantes ao estudo anterior relativamente à dilatação mediada pelo fluxo. Antes da intervenção, estes valores eram consideravelmente baixos. Foi também observado um aumento da concentração de arginina no plasma, bem como o aumento do rácio arginina/ADMA (dimetilarginina assimétrica, inibidor endógeno da NOS), retornando aos valores

normais (127). Anteriormente já tinha sido estudado o efeito da idade sobre a capacidade de dilatação dependente do endotélio nos dos vasos. Após a administração de acetilcolina (vasodilatador dependente do endotélio) em doentes com angina atípica, a resposta do endotélio foi analisada, e observou-se que com o avançar da idade, esta resposta era diminuída, sendo que a dilatação independente do endotélio nos vasos testada através da provocação com papaverina (agente vasodilatador, cujo mecanismo se baseia no relaxamento do músculo liso vascular) se manteve inalterada. Esta disfunção endotelial na microcirculação coronária foi atenuada após a administração intracoronária de L-arginina (160 mol/min durante 20 minutos) (136). A suplementação oral com L-arginina também se mostrou capaz de melhorar a dilatação vascular dependente do endotélio, sem alterar o grau de hiperémia reativa ou o diâmetro arterial basal, possivelmente pelo aumento da libertação de NO ou por facilitar a sua ação (137).

Um denominador comum é que são estudos de curta duração, sendo que a observação dos resultados é realizada ou no momento da administração, ou no máximo ao fim de 14 dias. De forma a compreender melhor os benefícios destes dois aminoácidos a longo

prazo, seria aconselhado retirar essas conclusões com base em estudos com uma maior duração de exposição à suplementação.

3.1.5 Disfunções neurológicas

A demência vascular (DV) é uma das causas mais comuns de demência, apenas superada pela doença de Alzheimer (DA). Contudo, a sua classificação e critérios de diagnóstico ainda não são totalmente claros, devido à dificuldade de compreender a relação entre a doença cerebrovascular e a deficiência cognitiva (138). A DV é caracterizada por um declínio cognitivo com origem cerebrovascular, resultado de acidentes vasculares cerebrais ou lesões subclínicas vasculares cerebrais, causando deficiências cognitivas que podem progredir para estados de demência graves, e que em muitos casos coexiste com a DA (139). Em doentes diagnosticados com DV, as células endoteliais cerebrais apresentam diversas alterações, nomeadamente uma diminuição no conteúdo mitocondrial, a perda das junções oclusivas, juntamente com uma disfunção da barreira hematoencefálica (devido à menor produção de NO, aumento das ROS e aumento da permeabilidade capilar) e diminuição na densidade capilar (140,141). A hipertensão, dislipidemia, obesidade, terapias de substituição hormonal, e fatores genéticos e ambientais são fatores de risco que podem precipitar o desenvolvimento desta patologia (142).

Nos vasos cerebrais, além das propriedades antiagregantes e antioxidantes já mencionadas, o sistema eNOS/nNOS/NO tem uma função protetora do Sistema Nervoso Central (SNC), regulando o tónus vascular e o fluxo sanguíneo cerebral, auxiliando também nos processos neurogênese, nomeadamente no crescimento axonal e na plasticidade sináptica, importantes nos processos de aprendizagem e memória. Em processos inflamatórios, a sobreprodução de NO por parte da iNOS pode desencadear neurotoxicidade, disfunção mitocondrial e induzir a apoptose via radical peroxinitrito. Por outro lado, a redução da produção de NO origina uma diminuição na perfusão cerebral, assim como um aumento da inflamação vascular (140).

O stress oxidativo é caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS), produzidas principalmente nas mitocôndrias das células endoteliais cerebrais, e tem uma grande influência no desenvolvimento deste tipo de demência. Nos vasos, NADPH oxidase, a mitocôndria e a cicloxigenase são as três principais fontes de ROS (143). Estas espécies reativas levam à depleção dos sistemas

antioxidantes da mitocôndria, como a GPx e a SOD. A ativação das células endoteliais cerebrais devido às ROS leva a um aumento da concentração de cálcio intracelular, aumentando a expressão de moléculas responsáveis pelo recrutamento de leucócitos e plaquetas, como a P-selectina e as quimiocinas. Por sua vez, os leucócitos ativados e plaquetas libertam moléculas pró-inflamatórias (TNF-alfa e IL-1) que medeiam a expressão da molécula de adesão vascular-1 e molécula de adesão intercelular-1, promovendo a migração e adesão leucocitária (140).

Estudos recentes relacionam este tipo de demência com níveis elevados de radicais livres e com uma depleção dos níveis de substâncias antioxidantes, como o alfa-tocoferol. A redução da biodisponibilidade de NO, devido ao aumento da produção de radicais livres, também está associada a este processo por favorecer o desenvolvimento de placas ateroscleróticas e levando à lesão dos próprios vasos (144). Isto ocorre devido à capacidade da enzima eNOS poder utilizar o oxigênio como substrato para produzir o radical superóxido, que por sua vez também tem a capacidade de reagir com a molécula de NO e formar o radical peroxinitrito (140). Outros eventos desencadeantes desta patologia são os períodos de hipóxia ou isquémicos, hemorragias, acumulação anormal da proteína beta-amilóide, lesões na substância branca e processos inflamatórios, que também podem coexistir (139,142).

A disfunção vascular a nível cerebral também pode ser associada à depressão (145). A hipoperfusão cerebral pode funcionar como fator desencadeante de depressão, por reduzir a síntese proteica crucial para os processos cognitivos e manutenção das funcionalidades do córtex cerebral. Esta redução na perfusão cerebral pode ser desencadeada pelo aumento da espessura da túnica média, aumento da rigidez arterial ou disfunção endotelial, processos que levam à diminuição do diâmetro do lúmen arterial (146). Por outro lado, a depressão pode levar ao desenvolvimento de alterações na vasculatura cerebral. Contudo, o seu mecanismo ainda não está totalmente esclarecido, sendo a redução do volume cerebral ou o aumento de produção de glucocorticóides e outras hormonas relacionadas com o stress possíveis fatores a ter em conta (145).

3.1.6 Disfunção erétil

A ereção peniana é um fenómeno neurovascular. O balanço entre os fatores psicológicos, hormonais, neurológicos, vasculares e musculares esqueléticos é

essencial para uma função erétil normal. Em casos em que algum destes fatores se encontre alterado, isoladamente ou em combinação, pode dar origem a disfunção erétil (DE) (147,148). A função erétil depende do envolvimento de três mecanismos que atuam sinérgica e simultaneamente: 1) aumento do fluxo de sangue arterial no pênis, mediado por processos neuronais (aumento da atividade parassimpática, que liberta acetilcolina a partir dos terminais nervosos dos corpos cavernosos; e aumento da libertação de substâncias vasodilatadoras das células endoteliais, nomeadamente NO), 2) relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos e 3) restrição da drenagem venosa do pênis, devido à compressão exercida pelo musculo liso trabecular relaxado contra a túnica albugínea fibroelástica (148–150).

A DE é definida pela incapacidade de obter ou manter ereções para relações sexuais satisfatórias (147). Embora não esteja completamente definido, vários autores apontam para uma persistência dos sintomas de seis meses até que se possa confirmar o diagnóstico (151). A etiologia da DE é multifatorial, podendo ser classificada como orgânica (maioria dos casos), neurogénica ou como uma combinação de ambas. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DE orgânica estão diretamente associados a um aumento do risco de desenvolver aterosclerose (principal causa de DE de origem vascular), como a diabetes mellitus, hipercolesterolémia, ser fumador ou apresentar patologias crónicas (147,149). As patologias que potenciam o desenvolvimento de aterosclerose são conhecidas por exacerbar o ambiente oxidativo nos vasos, levando à inativação do NO pelo radical superóxido, o que leva a uma depleção anormal de NO endotelial, o que resulta na disfunção do próprio endotélio. Além disto, a reação entre o NO e o radical superóxido origina o peroxinitrito, responsável pela indução da produção de agentes vasoconstritores, como a prostaglandina H₂ e o tromboxano A₂, que potenciam a apoptose das próprias células endoteliais (152).

Por outro lado, o aumento deste radical reduz os níveis de cálcio intracelular nas células endoteliais dos corpos cavernosos, diminuindo assim a sua capacidade de contratilidade (149).

Um estudo realizado em 2016 mostrou que os níveis de arginina e de citrulina na maioria destes doentes encontram-se diminuídos, principalmente no grupo com doença mais grave e com diagnóstico de DE aterogénica há pelo menos 10 meses. Todos os participantes do estudo tinham entre 25 e 60 anos, sem diagnóstico de hipertensão,

doença renal grave, insuficiência hepática, doença coronária, doença cerebrovascular, neuropatias, doenças endócrinas ou prostáticas, histórico de abusos de drogas ou álcool, tratamento prévio ou atual para DE e sem fazerem suplementação alimentar. Sendo substratos da NOS, a sua menor concentração pode ser uma das causas da incapacidade de produzir uma ereção satisfatória, pela diminuição de produção de NO (153).

A disfunção endotelial que muitos doentes com DM apresentam é um fator importante para a elevada prevalência de DE nesta população, devido à incapacidade de produção de substâncias vasodilatadoras (associado a uma diminuição na expressão da eNOS), bem como ao aumento de citocinas pro-inflamatórias (154,155).

Vários estudos mostraram que a suplementação oral com L-arginina é eficaz no tratamento da DE em modelos animais com DM, aumentando o relaxamento dependente do endotélio e neurogênico dos corpos cavernosos, através do aumento da síntese de NO (154). Em humanos observou-se uma melhoria da DE em doentes com doença leve e moderada, com doses entre os 1,5 e os 5,0 g, ingeridas diariamente, independentemente da frequência de relações, quando comparados com os placebos ou com a ausência de tratamento., melhorando também o *International Index of Erectile Function* (IIEF), um questionário baseado em 15 perguntas que analisam a função erétil, a função orgásmica, o desejo sexual, a satisfação nas relações e a satisfação geral, utilizado para avaliar a gravidade e a evolução da doença. Não foram observadas reações adversas graves, embora tenham sido reportadas reações adversas menores, nomeadamente cefaleias, insónias e prurido (156,157).

Num estudo realizado em 24 doentes com idades compreendidas entre os 46 e os 66 anos com doença leve foi estudado o efeito da suplementação com L-citrulina (1,5 g/dia) durante 1 mês, em comparação com um placebo. No fim do tratamento, metade dos doentes reportaram uma melhoria na função erétil, tendo-se mostrado “bastante satisfeitos” com o tratamento, ao contrário da outra metade, que se mostrou “não satisfeita”. De uma forma geral, a frequência de relações sexuais também aumentou. (158).

A suplementação oral com estes aminoácidos foi também estudada como adjuvante à terapêutica com os inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (iPDE5), comumente prescritos a estes doentes. Neste sentido, foi conduzido um estudo numa população de 108 homens diagnosticados com DM com queixas leves a moderadas de DE, em que

durante 8 semanas, foram submetidos a suplementação oral com 5 g de L-arginina por dia. No final do tratamento, e embora a suplementação oral com L-arginina per se tenha resultado numa melhoria das queixas dos doentes, os melhores resultados foram obtidos quando este aminoácido foi adicionado concomitantemente com o tratamento com os inibidores da PDE5, com a função erétil a sofrer melhorias significativas, bem como melhorias no IIEF (159).

Outro protocolo utilizou o tadalafil e a L-arginina, em monoterapia e em combinação, de forma a avaliar qual a estratégia com melhores resultados. Ao longo de 12 semanas, 300 doentes, com doença leve a grave, foram divididos em 3 grupos: um grupo em monoterapia com tadalafil (5 mg/dia), outro grupo em monoterapia com L-arginina (2500 mg/dia) e por fim um grupo com a combinação das duas moléculas. No fim do tratamento, foi a terapêutica combinada que surtiu os melhores resultados (160). Foram observados resultados semelhantes num estudo em doentes com mais de 60 anos, em que os 120 intervenientes foram divididos em 4 grupos: o grupo de controlo (que recebeu o placebo), o grupo tratado com tadalafil (5 mg), o grupo suplementado com L-arginina (5 g) e o grupo que recebeu a combinação de tadalafil e L-arginina (5 mg + 5 g). Ao fim das 6 semanas de tratamento, e através do questionário *Sexual Health Inventory for Men* (SHIM), o tratamento combinado foi aquele que obteve os melhores resultados em relação aos restantes grupos, apesar de os grupos em monoterapia também terem obtido resultados positivos (161). Além do tadalafil, também o sildenafil (50 mg dia a cada dois dias) foi estudado em combinação com a suplementação diária com L-arginina (3 g/dia). Ao fim das 8 semanas do estudo, os resultados foram obtidos através do score obtido no IIEF, e os resultados foram concordantes com os supramencionados (162).

Apesar de menos eficazes em comparação com a terapêutica farmacológica mais comumente utilizada, a suplementação oral com estes aminoácidos provou ser segura e bem tolerada pelos doentes (158), podendo ser utilizada naqueles com doença ligeira. Por outro lado, a combinação destas duas estratégias parece ser a que mais efeitos benéficos tem para o doente.

3.1.7 Fenómeno de Raynaud

O fenómeno de Raynaud é uma condição caracterizada pela ocorrência de vasoespasmos de forma recorrente, principalmente nos dedos das mãos ou dos pés,

podendo ainda ser observado na língua, nas orelhas, no nariz e nos mamilos (163). A prevalência desta condição é maior em regiões cujo clima é mais frio, pois a exposição ao frio é um dos fatores desencadeantes destes episódios, assim como situações causadoras de stress. Durante os episódios, os dedos começam por ficar pálidos e cianosados, com sensação de dor e dormência. Quando o fluxo sanguíneo é restabelecido, a pele aparece ruborizada (163,164).

Apesar de não estarem totalmente definidos, os fatores de risco associados ao aparecimento deste fenómeno parecem estar relacionados com o clima, o sexo, a história familiar da doença e a presença de DCV de base (163). O aparecimento deste fenómeno foi também associado à exposição a medicamentos antineoplásicos e à exposição ocupacional a vibrações mecânicas (165,166).

O fenómeno de Raynaud pode ser classificado em primário, caso não exista nenhuma patologia associada, ou secundário, caso exista outra patologia que possa desencadear este fenómeno. Neste último caso, as exacerbações estão especialmente relacionadas com fatores dependentes do endotélio, podendo exacerbar os vasoespasmos nos doentes pela mediação da proliferação e contração da musculatura lisa dos vasos (167).

Os episódios de vasoespasmos da doença de Raynaud resultam numa isquémia seguida de reperfusão, o que leva ao aumento de produção de radicais livres de oxigénio nos vasos que, por sua vez, danificam os tecidos e levam à lesão do endotélio. Os danos tecidulares podem ativar as cascatas inflamatórias, o que contribui para amplificar as lesões (163).

O NO parece ter um papel duplo nesta patologia. Por um lado, a sua deficiente produção por parte da eNOS resulta na isquémia dos tecidos, enquanto que a inflamação resultante do processo isquémico leva à ativação de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez aumentam a produção de NO, por parte da iNOS, para níveis superiores ao normal (168,169). A formação de ROS, resultantes dos episódios de I/R, tem a capacidade de oxidar o NO, diminuindo assim a sua biodisponibilidade e limitando a sua ação sobre os vasos, além de originar espécies reativas que acabam por danificar os tecidos (168,170). Os danos estruturais nas paredes dos vasos refletem-se numa redução na expressão do mRNA que codifica para a NOS, reduzindo assim os níveis desta última e afetando a síntese de NO (170). Por outro lado, níveis elevados de NO nesta patologia também pode ser explicado como uma tentativa de compensar a falta de

capacidade dos vasos em dilatar, e normalmente é associado a fenómeno de Raynaud primário (168), provavelmente em estados iniciais da doença, onde o endotélio ainda é capaz de produzir NO. Além do NO, a deficiência de outras moléculas vasodilatadoras, como a prostaciclina, o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) ou o péptido arterial natriurético podem aumentar a responsividade dos vasos a moléculas vasoconstritoras, aumentando a possibilidade de vasoespasmos.

A vasoconstrição em resposta ao frio é mediada por vias de transmissão neuronais simpáticas, pelo que distúrbios nestas vias neuronais também poderão estar associados à patogénese (170).

A suplementação oral com L-arginina foi estudada também nesta patologia como uma possível abordagem farmacoterapêutica, tendo sido obtidos resultados contraditórios. Por um lado, a suplementação com 8 g/dia de L-arginina ao longo de 28 dias não surtiu efeitos significativos na resposta vascular à vasodilatação dependente e independente do endotélio em indivíduos com doença de Raynaud primária, sendo esta resposta já reduzida nestes doentes, quando comparados com o grupo de controlo. Estes resultados fizeram os investigadores refutarem a hipótese de que um défice na biodisponibilidade de substrato para a produção de NO estivesse na origem na incapacidade vasodilatadora nestes doentes, tendo colocado a hipótese de o problema estar na incapacidade do próprio NO em induzir o relaxamento vascular (171). Estudos mais recentes sugerem ainda que possa ser uma diminuição na produção de agentes vasodilatadores, como o NO e a prostaciclina, que esteja na origem da incapacidade vasodilatadora do endotélio, não sendo ainda possível saber qual o mecanismo ao certo (172).

Noutro estudo, a suplementação oral de L-arginina (4 g duas vezes ao dia) também não se mostrou eficaz no tratamento de doentes diagnosticados com doença de Raynaud primária (173). Contudo, em doentes com doença de Raynaud secundária, os resultados foram mais promissores. Utilizando a mesma metodologia, foi observado um aumento na amplitude de pulso na região palmar dos dedos, bem como um aumento na vasodilatação nessa mesma região (173). A perfusão com L-arginina (8,5 mg/min) também teve resultados positivos, em ambos os tipos, na redução das exacerbações da doença quando existe exposição a fatores desencadeantes (neste caso, o frio) (174).

Uma possível explicação para estes resultados é o facto de a L-arginina potenciar a produção de NO por parte do endotélio vascular, e assim bloquear as exacerbações desta

doença (174). Além desta ação, a L-arginina vai também impedir a inibição das NOS por parte da ADMA, mantendo assim a normal produção de NO (169).

Apesar de a L-arginina poder ser uma opção terapêutica a considerar para estes doentes, principalmente nos doentes diagnosticados com síndrome de Raynaud secundária, são necessários estudos mais robustos de forma a criar evidências mais fortes em relação ao seu uso. Uma das dificuldades do estudo nesta população é o facto de ser necessário usar testes de provocação de exacerbações, o que pode causar receio nos doentes em participar nestes estudos, o que a somar ao baixo número de indivíduos com esta condição, se torna ainda mais difícil o seu estudo. Também poderá ser relevante estudar se a suplementação com L-citrulina terá resultados semelhantes, ou até melhores, no controlo desta patologia.

3.1.8 Hipertensão

A hipertensão é definida por valores de pressão arterial sistólica iguais ou superiores a 140 mmHg e/ou valores de pressão arterial diastólica iguais ou superiores a 90 mmHg (175). Quanto à etiologia, a hipertensão distingue-se em dois tipos, a primária, cuja natureza é desconhecida, e a secundária, com origem identificável e na maioria das vezes corrigível (176). Estima-se que cerca de 30% da população mundial em idade adulta seja afetada por esta condição, sendo a sua prevalência superior nos países com rendimentos mais baixos (175). Em Portugal, este valor sobe para os 42%, e normalmente aparece associada a outras patologias, como a dislipidémia ou a diabetes mellitus (177,178). No caso da hipertensão primária o principal mecanismo fisiopatológico está centrado na incapacidade do endotélio em promover a dilatação dos vasos, contribuindo assim para o aumento da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, da pressão arterial (179). Já hipertensão secundária é uma doença com menor prevalência (10% dos doentes diagnosticados com hipertensão) que tem como causa uma outra patologia subjacente que, sendo tratada, pode reverter este estado hipertensivo. As doenças mais comumente associadas a este tipo de hipertensão são as doenças renais (o aparecimento de hipertensão glomerular resultado, por exemplo, do desenvolvimento de lesões no parênquima renal, originando danos na estrutura renal, diminuindo a sua capacidade em excretar o excesso de fluídos e de sódio); o hiperaldosteronismo, que aumenta a reabsorção de sódio e de água, resultando num aumento da volémia; a doença de Cushing, devido ao aumento da secreção de mineralocorticoides, onde se inclui a aldosterona; e a apneia de sono obstrutiva, devido

à obstrução mecânica das vias aéreas superiores que provoca episódios de abaixamento da tensão parcial de oxigênio, compensada com aumento da resistência vascular periférica (176,180).

Para além do aumento do tónus vascular, a hipertensão arterial está associada a uma redução na elasticidade das artérias, esta última devido ao aumento da espessura da íntima média. Estas alterações nas paredes das artérias reduzem a perfusão dos tecidos por elas irrigados, sendo as sequelas mais graves quando estas alterações no coração, no cérebro e nos rins (179,181).

A diminuição da síntese de NO pode ser devido a 1) falta de substrato da NOS, L-arginina, 2) falta de cofatores da reação, como a BH₄, 3) redução da expressão da NOS endotelial ou 4) o aumento de inibidores endógenos da NOS, como derivados da ADMA. Outros dos motivos para a diminuição da biodisponibilidade do NO são a sua inativação pelas ROS, sendo a deficiência de antioxidantes como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol) e a glutathione fatores desencadeantes deste fenómeno, reduzindo a capacidade antioxidante nos vasos (181).

A biodisponibilidade do NO é determinada pelo balanço entre a sua formação e inativação (182). Em estudos realizados em humanos, verificou-se uma diminuição da produção de NO por parte dos doentes diagnosticados com hipertensão primária, em estados menos avançados da doença, sendo que com a evolução desta, a biodisponibilidade de NO continuava a reduzir-se, desta feita devido ao aumento de ROS. Também se observou uma diminuição da sensibilidade da musculatura lisa ao NO. Noutros estudos, além de confirmada a diminuição na concentração de NO basal, também a resposta a fármacos que potenciam a produção de NO se encontrava reduzida. Este parâmetro parece ter correlação com o risco de eventos cardiovasculares (181). Em doentes hipertensos, o sistema de transporte da L-arginina y_+ para o interior das células mantém-se intacto, fornecendo assim o substrato das NOS para a produção de NO, pelo que a suplementação com este aminoácido pode ter um efeito benéfico nesta condição (182).

Em 2002, um estudo investigou o efeito da administração oral de L-arginina (6 g uma hora e meia antes do protocolo de oclusão suprassistólica) em doentes com hipertensão primária, não tendo sido observadas melhorias significativas na pressão arterial e na frequência cardíaca, sendo que o único parâmetro com resultados positivos foi o

aumento da dilatação dependente do endotélio (137). Em mulheres com hipertensão gestacional que, adicionalmente, podiam ou não apresentar proteinúria, a administração de L-arginina foi realizada em duas etapas: nos primeiros 5 dias, as participantes receberam 20 g de L-arginina em 500 ml de solução por perfusão, seguido de 2 semanas com administrações orais diárias de 4 g; já o grupo controlo recebeu um placebo. Ao fim de 6 dias, a pressão arterial no grupo tratado com L-arginina tinha sido significativamente reduzida (183). Foi também estudado o efeito da L-arginina em doentes hipertensos com angina microvascular. Durante 4 semanas, estes doentes ingeriram um total de 6 g de L-arginina repartidos por 3 tomas ao longo do dia. No fim do tratamento, observou-se uma melhoria significativa da pressão arterial sistólica em repouso. A qualidade de vida apresentou também melhorias, fruto não só da redução da pressão arterial, mas também da diminuição da frequência de crises anginosas e da necessidade de recorrer à medicação de emergência, neste caso a nitroglicerina (184).

A melancia é uma fonte de citrulina por excelência. Sabendo isto, um estudo usou o extrato de melancia como suplemento contendo citrulina, numa dose de 6 g por dia, ao longo de 6 semanas, em indivíduos diagnosticados com pré-hipertensão ou hipertensão de grau 1, mas sem prescrição de terapêutica anti hipertensora. No fim do tratamento, tanto a pressão arterial sistólica como a diastólica diminuíram significativamente em doentes obesos pré-hipertensos e hipertensos, com idade média de 58 anos, sem nunca terem sido diagnosticados com hipertensão ou outras doenças cardiovasculares (53,185).

O efeito da suplementação oral com L-citrulina (6 g/dia) foi também estudado em mulheres obesas, pré-hipertensivas e já na pós-menopausa, sendo reportados resultados positivos a nível da pressão arterial ao fim de 8 semanas de tratamento, com uma redução em média de 7 mmHg da pressão arterial sistólica e 9 mmHg da pressão arterial diastólica. A pressão arterial também foi reduzida em doentes com insuficiência cardíaca, mas com a fração de ejeção preservada, após tratamento durante 8 semanas (186).

Uma meta-análise realizada em 2018 incluiu estudos com uma população entre 12 e 34 pessoas, com idades compreendidas entre os 22 e os 71 anos. As doses de citrulina variaram entre as 3 e as 9 g/dia. Estas intervenções tiveram um resultado positivo na pressão arterial sistólica, com uma redução, em média, de 4 mmHg. No que diz respeito

à pressão arterial diastólica, a redução só é significativa nos estudos cujos a dose é igual ou superior a 6 g/dia, sendo neste caso dependente da dose (187).

Os ensaios clínicos até à data sugerem que a L-arginina é o aminoácido que apresenta resultados mais promissores no tratamento da hipertensão. Embora a suplementação com L-citrulina também pareça ser benéfica, não existe ainda consenso quanto ao seu real valor nesta condição, isto porque das últimas três revisões de literatura, apenas duas concluíram que este aminoácido era eficaz no tratamento da hipertensão, sendo que estes resultados podem estar relacionados com os critérios de seleção dos estudos de diferentes autores, visto que do ponto de vista teórico, ambas as moléculas terão a capacidade de, até certo ponto, reduzirem a pressão arterial, uma teoria suportada por estudos que demonstraram uma capacidade de reduzir a pressão arterial em 7/3 mmHg, valores superiores à média obtida pela suplementação com L-arginina (5,39/2,66 mmHg) (188).

Contudo, são necessários estudos mais longos para determinar a sua eficácia na redução da pressão arterial a longo termo, bem como estabelecer a dosagem necessária para a obtenção do efeito e averiguar se existe uma relação de dose-resposta, além da sua segurança na utilização por períodos maiores e possíveis efeitos adversos.

3.1.9 Sépsis

A sépsis é uma resposta inflamatória sistémica em contexto de infeção, sendo um problema de saúde grave devido à sua elevada morbidade e mortalidade, necessitando o doente de cuidados intensivos (189). Em doentes que desenvolveram sépsis, seja após trauma ou intervenção cirúrgica, verificaram-se níveis bastante baixos de concentração plasmática de arginina, capaz de conduzir à disfunção do endotélio e do sistema imunitário. Foi proposto que esta diminuição na concentração de arginina pode ser consequência da diminuição da absorção gastrointestinal, do aumento da atividade da arginase e da NOS, e do aumento da utilização de arginina na síntese proteica (189–192). O aumento das necessidades metabólicas implica um maior consumo de arginina para a síntese proteica, essencialmente de proteínas de fase aguda, o que justifica a sua redução plasmática (192). Em estudos anteriores observou-se que, após a infusão de uma solução contendo diferentes aminoácidos em doentes com diagnóstico de sépsis provocada por infeções intra-abdominais, pulmonares ou dos tecidos moles, a concentração de arginina no plasma era relativamente baixa em comparação aos

restantes aminoácidos, apoiando a hipótese de que as necessidades metabólicas para este aminoácido estão aumentadas nestes doentes (193). Em doentes que morreram de sépsis, os níveis de arginina foram menores do que naqueles que sobreviveram (191).

Em animais, a suplementação oral com citrulina provou ser benéfica. Após a indução da sépsis, os modelos foram suplementados através da ração com uma mistura contendo 8% de citrulina, durante 3 semanas. Quando comparado com o grupo controlo (ração normal), o grupo suplementado com a citrulina obteve resultados semelhantes quanto à sobrevivência. Contudo, ao fim de 3 dias, os níveis da interleucina-6 (mediador pró-inflamatório) eram menores neste mesmo grupo, não afetando a secreção de mediadores anti-inflamatórios, como é o caso da interleucina-10 (IL-10) (194).

Também a produção de citrulina é afetada em doentes em choque séptico. A sua produção, quando comparada com a de indivíduos saudáveis, aparece diminuída, consequência da menor e mais lenta produção de arginina, diminuindo a biodisponibilidade destes dois aminoácidos (189). A síntese intestinal de citrulina está dependente da disponibilidade da glutamina e da prolina. Uma diminuição na produção de citrulina parece refletir uma diminuição na biodisponibilidade destes dois aminoácidos. Os níveis séricos destes dois aminoácidos encontram-se reduzidos em doentes com sépsis, e correlacionam-se com as concentrações de citrulina (195). A menor ingestão deste aminoácido e a diminuição da absorção proteica (devido ao menor fluxo sanguíneo mesentérico) nestes estados são outras causas também conhecidas (196,197).

A deficiente excreção renal de nitratos/nitritos contribui para os níveis elevados de NO no plasma nestes doentes, embora seja o aumento da atividade da iNOS o principal fator para o aumento da concentração plasmática de NO (147,196,198). Além da menor excreção por parte dos rins, a redução do seu metabolismo no próprio plasma é um fator a ter em conta para este aumento (196). Contudo, em crianças em choque séptico foi demonstrado que o metabolismo que transforma a arginina em NO apresenta uma atividade aumentada quando comparado com o grupo de controlo de crianças saudáveis, associado consequentemente a um aumento de NO sérico. O aumento deste agente vasodilatador parece também ser um indicador da severidade da infeção (199).

O benefício do uso de substâncias dadoras de NO no tratamento da sépsis em humanos ainda não foi devidamente estabelecido, existindo tanto estudos que reportam um

benefício significativo, como estudos cujo benefício não foi comprovado ou até colocando em causa a própria segurança do tratamento (200). O uso de arginina nestes doentes também não parece aportar melhorias significativas tanto ao estado geral do doente, como à evolução da doença. Na sua maioria, a suplementação oral com arginina aumentou as concentrações plasmáticas da mesma. Contudo, este aumento não foi acompanhado por um aumento na produção de NO. As taxas de mortalidade e de complicações, bem como a duração do internamento também não parecem ser afetadas pela suplementação (196).

Em 135 doentes diagnosticados com sépsis associada à presença de síndrome respiratória aguda grave (SDRA) foram observados níveis plasmáticos significativamente reduzidos de citrulina, estando esta diminuição associada ao aparecimento de SDRA nestes doentes. Também foram observados níveis de arginina no plasma abaixo dos valores normais de referência (201).

A suplementação com arginina em doses entre os 3 e os 8 g/dia raramente resultaram em efeitos adversos em doentes diagnosticados com sépsis. Apenas doses acima dos 9 g/dia provocaram reações adversas, como desconforto gastrointestinal, vômitos e diarreia (196).

Em parte, estes resultados discordantes podem ser fruto da dificuldade em estudar este tipo de doentes, seja pela dificuldade em assegurar a sua integração em estudos científicos, ou seja pela condição debilitada em que se encontram, o que condiciona a condução destes estudos. Também o facto de na maioria dos estudos serem usadas combinações de vários nutrientes fazem com que seja mais complicado extrair o real benefício da arginina e da citrulina, sendo um obstáculo difícil de ultrapassar visto que as necessidades nutricionais dos doentes nesta condição não se resumem a estes dois aminoácidos.

4 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o estado da arte acerca do potencial terapêutico da L-arginina e da L-citrulina em diversos modelos e patologias cardiovasculares, particularmente naquelas em que a disfunção endotelial tem um papel importante na patogênese, fazendo do aumento da biodisponibilidade de NO o principal mecanismo explorado. Foi possível concluir que ambos os aminoácidos têm um potencial terapêutico relevante, sendo capazes de retardar a progressão de diversas DCV e melhorar significativamente a qualidade de vida dos doentes, comprovado pela melhoria de parâmetros clínicos e laboratoriais. Ainda assim, no futuro, será relevante aprofundar o estudo desta estratégia terapêutica a outras moléculas com mecanismos de ação semelhantes, bem como, através de ensaios clínicos, definir curvas de dose-efeito para as diferentes patologias estudadas.

5 Referências Bibliográficas

1. Penninx BWJH. Depression and cardiovascular disease: Epidemiological evidence on their linking mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 2017;74:277–86.
2. Stewart J, Manmathan G, Wilkinson P. Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2017;6:204800401668721.
3. Gheorghe A, Griffiths U, Murphy A, Legido-Quigley H, Lamptey P, Perel P. The economic burden of cardiovascular disease and hypertension in low- and middle-income countries: A systematic review. *BMC Public Health.* 2018;18(1):1–11.
4. Bhatnagar A. Environmental Determinants of Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2017;121(2):162–80.
5. Pedersen SS, von Känel R, Tully PJ, Denollet J. Psychosocial perspectives in cardiovascular disease. *Eur J Prev Cardiol.* 2017;24(3):108–15.
6. Khan MS, Aouad R. The Effects of Insomnia and Sleep Loss on Cardiovascular Disease. *Sleep Med Clin.* 2017;12(2):167–77.
7. Pflieger M, Winslow BT, Mills K, Dauber IM. Medical management of stable coronary artery disease. *Am Fam Physician.* 2011;83(7):819–26.
8. Almendra R, Santana P. Mortality from cardiovascular diseases in the municipalities of mainland Portugal: Spatiotemporal evolution between 1991 and 2017. *Geogr Environ Sustain.* 2020;13(1):128–33.
9. Ylä-Herttuala S, Bridges C, Katz MG, Korpisalo P. Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: Dream or vision? *Eur Heart J.* 2017;38(18):1365–71.
10. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(1):1–25.
11. Walker IF, Garbe F, Wright J, Newell I, Athiraman N, Khan N, et al. The Economic Costs of Cardiovascular Disease, Diabetes Mellitus, and Associated Complications in South Asia: A Systematic Review. *Value Heal Reg Issues*

12. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al. European society of cardiology: Cardiovascular disease statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020;41(1):12–85.
13. De Smedt D, De Backer T, Petrovic M, De Backer G, Wood D, Kotseva K, et al. Chronic medication intake in patients with stable coronary heart disease across Europe: Evidence from the daily clinical practice. Results from the ESC EORP European Survey of Cardiovascular Disease Prevention and Diabetes (EUROASPIRE IV) Registry. *Int J Cardiol*. 2020;300:7–13.
14. Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2006;45(5):268–76.
15. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2.
16. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med*. 2003;115(8 SUPPL. 1):99–106.
17. Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*. 2006;61(6):326–34.
18. Mozos I, Malainer C, Horbanczuk J, Gug C, Stoian D, Luca CT, et al. Inflammatory markers for arterial stiffness in cardiovascular diseases. *Front Immunol*. 2017;8(August):1–16.
19. Cannon RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: Focus on the endothelium. *Clin Chem*. 1998;44(8 II):1809–19.
20. Gracia-Sancho J, Marrone G, Fernández-Iglesias A. Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(4):221–34.
21. LÜSCHER TF. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1993;23(11):670–85.
22. Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: Can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2005;288(5 57-5).
23. Morris SM. Arginine metabolism revisited. *J Nutr*. 2016;146(12):2579S-2586S.

24. Morris SM. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr.* 2004;134(10 SUPPL.):2743–7.
25. Stuehr DJ. and Clinical Significance Enzymes of the L -Arginine to Nitric Oxide Pathway 1 , 2. *Science (80-).* 2004;(12):2748–51.
26. Morris SM. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2002;22(58):87–105.
27. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1979;5(3):211—224.
28. Joyner MJ, Dietz NM. Nitric oxide and vasodilation in human limbs. *J Appl Physiol.* 1997;83(6):1785–96.
29. Butler AR, Williams DLH. The physiological role of nitric oxide. *Chem Soc Rev* 1993;22(4):233–41.
30. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(3):443–52.
31. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, et al. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9).
32. Berry L. *Martindale: The Complete Drug Reference - 35th edition* Martindale: The Complete Drug Reference - 35th edition. *Nurs Stand.* 2007;21(20):31–31.
33. Wu Z, Hou Y, Hu S, Bazer FW, Meininger CJ, McNeal CJ, et al. Catabolism and safety of supplemental l-arginine in animals. *Amino Acids.* 2016;48(7):1541–52.
34. Bescós R, Gonzalez-Haro C, Pujol P, Drobnic F, Alonso E, Santolaria ML, et al. Effects of dietary L-arginine intake on cardiorespiratory and metabolic adaptation in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2009;19(4):355–65.
35. Utagawa T. and Clinical Significance Production of Arginine by Fermentation 1. *J Nutr.* 2004;134:2854–7.
36. Man Z, Xu M, Rao Z, Guo J, Yang T, Zhang X, et al. Systems pathway engineering of *Corynebacterium crenatum* for improved L-arginine production.

- Sci Rep. 2016;6(June):1–10.
37. Wapnir RA, Wingertzahn MA, Teichberg S. L-arginine in low concentration improves rat intestinal water and sodium absorption from oral rehydration solutions. *Gut*. 1997;40(5):602–7.
 38. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: What’s new to NO? *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2017;312(3):C254–62.
 39. Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M, et al. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol Res*. 2017;66:S159–72.
 40. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):766–75.
 41. Witte MB, Barbul A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen*. 2003;11(6):419–23.
 42. Verma N, Singh AK, Singh M. L-arginine biosensors: A comprehensive review. *Biochem Biophys Reports*. 2017;12(September):228–39.
 43. Cziráki A, Lenkey Z, Sulyok E, Szokodi I, Koller A. L-Arginine-Nitric Oxide-Asymmetric Dimethylarginine Pathway and the Coronary Circulation: Translation of Basic Science Results to Clinical Practice. *Front Pharmacol*. 2020;11(September):1–20.
 44. Cynober L, Boucher J Le, Vasson MP. Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1995;6(8):402–13.
 45. Dall’Asta V, Bussolati O, Sala R, Rotoli BM, Sebastio G, Sperandeo MP, et al. Arginine transport through system γ +L in cultured human fibroblasts: Normal phenotype of cells from LPI subjects. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2000;279(6 48-6):1829–37.
 46. O’Kane RL, Viña JR, Simpson I, Zaragoza R, Mokashi A, Hawkins RA. Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system γ +. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2006;291(2):412–9.
 47. Shin S, Mohan S, Fung HL. Intracellular l-arginine concentration does not

- determine NO production in endothelial cells: Implications on the “ l-arginine paradox.” *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414(4):660–3.
48. Blachier F, Darcy-Vrillon B, Sener A, Duée PH, Malaisse WJ. Arginine metabolism in rat enterocytes. *BBA - Mol Cell Res.* 1991;1092(3):304–10.
 49. Ofluoglu E, Pasaoglu H, Pasaoglu A. The effects of caffeine on L-arginine metabolism in the brain of rats. *Neurochem Res.* 2009;34(3):395–9.
 50. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994;298(2):249–58.
 51. Rimando AM, Perkins-Veazie PM. Determination of citrulline in watermelon rind. *J Chromatogr A.* 2005;1078(1–2):196–200.
 52. Bahri S, Zerrouk N, Aussel C, Moinard C, Crenn P, Curis E, et al. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. *Nutrition.* 2013;29(3):479–84.
 53. Allerton TD, Proctor DN, Stephens JM, Dugas TR, Spielmann G, Irving BA. L-citrulline supplementation: Impact on cardiometabolic health. *Nutrients.* 2018;10(7):1–24.
 54. Vadgama J V., Evered DF. Characteristics of L-citrulline transport across rat small intestine In vitro. *Pediatr Res.* 1992;32(4):472–8.
 55. WANDERS RJA, VAN ROERMUND CWT, MEIJER AJ. Analysis of the control of citrulline synthesis in isolated rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem.* 1984;142(2):247–54.
 56. Jones ME, Anderson AD, Anderson C, Hodes S. Citrulline synthesis in rat tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1961;95(3):499–507.
 57. Featherston WR, Rogers QR, Freedland RA. Relative importance of kidney and liver in synthesis of arginine by the rat. *Am J Physiol.* 1973;224(1):127–9.
 58. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol.* 2005;100(2):179–90.
 59. Szabó G, Bährle S, Bátkai S, Stumpf N, Dengler TJ, Zimmermann R, et al. L-arginine: Effect on reperfusion injury after heart transplantation. *World J Surg.* 1998;22(8):791–8.

60. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N, Cordis GA, Engelman RM, Rousou JA, et al. L-Arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(5):1275–81.
61. Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-Reperfusion-Induced Pancreatic Microvascular Injury: An Intravital Fluorescence Microscopic Study in Rats. *Dig Dis Sci.* 1996;41(5):823–30.
62. Robles L. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Pancreatitis: Effect of Antioxidant Therapy. *Pancreat Disord Ther.* 2013;03(01):1–8.
63. Benz S, Obermaier R, Wiessner R, Breitenbuch P V., Burska D, Weber H, et al. Effect of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the pancreas. *J Surg Res.* 2002;106(1):46–53.
64. Obermaier R, Von Dobschuetz E, Muhs O, Keck T, Drognitz O, Jonas L, et al. Influence of nitric oxide on microcirculation in pancreatic ischemia/reperfusion injury: An intravital microscopic study. *Transpl Int.* 2004;17(4):208–14.
65. Von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK, et al. Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas.* 2008;36(4):377–84.
66. Dikmen K, Bostanci H, Gobut H, Yavuz A, Gulbahar O, Akyurek N. Effects of L-arginine on the release of heme oxygenase-1 on ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis in rats. 2018;11(10):11061–9.
67. Ijaz S, Winslet MC, Seifalian AM. The effect of consecutively larger doses of L-arginine on hepatic microcirculation and tissue oxygenation in hepatic steatosis. *Microvasc Res.* 2009;78(2):206–11.
68. Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. The role of nitric oxide in the modulation of hepatic microcirculation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis. *Microvasc Res.* 2005;70(3):129–36.
69. McCuskey RS, Ito Y, Robertson GR, McCuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2004;40(2):386–93.
70. Bauer C, Walcher F, Kalweit U, Larsen R, Marzi I. Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J Hepatol.* 1997;27(6):1089–

- 95.
71. Uhlmann D, Scommotau S, Witzigmann H, Spiegel HU. Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 1998;30(3):175–84.
 72. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology.* 1995;21(4):1138–43.
 73. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2008;147(1):153–9.
 74. Shiraishi M, Hiroyasu S, Nagahama M, Miyaguni T, Higa T, Tomori H, et al. Role of Exogenous L -Arginine in Hepatic Ischemia – Reperfusion Injury 1. 1997;434(69):429–34.
 75. Acquaviva R, Lanteri R, Li Destri G, Caltabiano R, Vanella L, Lanzafame S, et al. Beneficial effects of rutin and L-arginine coadministration in a rat model of liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(3):664–70.
 76. Atef Y, El-Fayoumi HM, Abdel-Mottaleb Y, Mahmoud MF. Effect of cardamonin on hepatic ischemia reperfusion induced in rats: Role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 2017;815(September):446–53.
 77. Koti RS, Yang W, Dashwood MR, Davidson BR, Seifalian AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transplant.* 2002;8(12):1182–91.
 78. Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM, Omran FM. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology.* 2007;234(1–2):124–34.
 79. Gazyakan E, Hirche C, Reichenberger MA, Germann G, Roth C, Engel H. Inducible Nitric Oxide Synthase and L-Arginine Optimizes Nitric Oxide Bioavailability in Ischemic Tissues Under Diabetes Mellitus Type 1. *Ann Plast Surg.* 2020;84(1):106–12.

80. Gazyakan E, Hirche C, Reichenberger MA, Urbach O, Germann G, Engel H. Modulation of Nitric Oxide Bioavailability Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Type II Diabetes. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* 2021;74(1):183–91.
81. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1994;266(6 29-6).
82. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. Vol. 100, *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1997. p. 1227–33.
83. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'Brien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci.* 1994;39(2):366–73.
84. De La Lastra CA, Cabeza J, Motilva V, Martin MJ. Melatonin protects against gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pineal Res.* 1997;23(2):47–52.
85. Liu Y, Gou L, Yin C, Yin X, Zheng J. A preliminary study on protective effect of L-citrulline against ischemia-reperfusion induced gastric mucosal lesions in rat. *Indian J Pharmacol.* 2012;44(1):31–5.
86. Gou L, Zhang L, Yin C, Jia G, Yin X, Zhuang X, et al. Protective effect of L-citrulline against acute gastric mucosal lesions induced by ischemiareperfusion in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011;89(5):317–27.
87. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651–5.
88. Sayan H, Ozacmak VH, Altaner S, Aktas RG, Arslan SO. Protective effects of L-arginine on rat terminal ileum subjected to ischemia/reperfusion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46(1):29–35.
89. Sukhotnik I, Helou H, Mogilner J, Lurie M, Bernsteyn A, Coran AG, et al. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(3):191–6.
90. Zhao X, Alexander JS, Zhang S, Zhu Y, Sieber NJ, Aw TY, et al. Redox regulation of endothelial barrier integrity. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(4 25-4):879–86.

91. Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue T. Sustained nitric oxide production via L-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2000;89(1):13–9.
92. Lai CH, Lee CH, Hung CY, Lo HC. Oral citrulline mitigates inflammation and jejunal damage via the inactivation of neuronal nitric oxide synthase and nuclear factor-B in intestinal ischemia and reperfusion. *J Parenter Enter Nutr.* 2017;41(3):422–35.
93. Wijnands KAP, Vink H, Briedé JJ, van Faassen EE, Lamers WH, Buurman WA, et al. Citrulline a more suitable substrate than arginine to restore NO production and the microcirculation during endotoxemia. *PLoS One.* 2012;7(5):1–11.
94. Tomé LA, Yu L, De Castro I, Campos SB, Seguro AC. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant.* 1999;14(5):1139–45.
95. Gholampour F, Khangah L, Vatanparast J, Karbalaei-Heidari HR, Owji SM, Bahaoddini A. The role of nitric oxide in the protective action of remote ischemic per-conditioning against ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rat. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(6):600–6.
96. Mahmoud IM, Hussein AEAM, Sarhan ME, Awad AA, El Desoky I. Role of combined L-arginine and prostaglandin E1 in renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron - Physiol.* 2007;105(4):57–65.
97. Chander V, Chopra K. Renal protective effect of molsidomine and L-arginine in ischemia-reperfusion induced injury in rats. *J Surg Res.* 2005;128(1):132–9.
98. Fu X, Li S, Jia G, Gou L, Tian X, Sun L, et al. Protective effect of the nitric oxide pathway in L-citrulline renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Folia Biol (Czech Republic).* 2013;59(6):225–32.
99. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. Vol. 59, *Journal of Surgical Research.* 1995. p. 772–9.
100. Yamashita J, Ogata M, Itoh M, Yamasawa H, Shimeda Y, Takaoka M, et al. Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42(3):419–27.

101. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(5):463–88.
102. Hsieh K-F, Shih J-M, Shih Y-M, Pai M-H, Yeh S-L. Arginine administration increases circulating endothelial progenitor cells and attenuates tissue injury in a mouse model of hind limb ischemia/reperfusion. *Nutrition*. 2018;55:29–35.
103. Yabuki Y, Shioda N, Yamamoto Y, Shigano M, Kumagai K, Morita M, et al. Oral l-Citrulline administration improves memory deficits following transient brain ischemia through cerebrovascular protection. *Brain Res* 2013;1520:157–67.
104. Tangphao O, Grossmann M, Chalon § S, Hoffman BB, Blaschke TF. Pharmacokinetics of intravenous and oral l-arginine in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(3):261–6.
105. Pernow J, Böhm F, Beltran E, Gonon A. L-Arginine protects from ischemia-reperfusion-induced endothelial dysfunction in humans in vivo. *J Appl Physiol*. 2003;95(6):2218–22.
106. Settergren M, Böhm F, Malmström RE, Channon KM, Pernow J. l-Arginine and tetrahydrobiopterin protects against ischemia/reperfusion-induced endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2009;204(1):73–8.
107. Booi DI, Debats IJG, Deutz NEP, Van Der Hulst RRWJ. Arginine improves microcirculation in the free transverse rectus abdominis myocutaneous flap after breast reconstruction: A randomized, double-blind clinical trial. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(6):2216–23.
108. Le Roux-Mallouf T, Vibert F, Doutreleau S, Verges S. Effect of acute nitrate and citrulline supplementation on muscle microvascular response to ischemia-reperfusion in healthy humans. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42(9):901–8.
109. Silva EP, Borges LS, Mendes-da-Silva C, Hirabara SM, Lambertucci RH. l-Arginine supplementation improves rats' antioxidant system and exercise performance. *Free Radic Res*. 2017;51(3):281–93.
110. Borghouts LB, Keizer HA. *Borghouts 2000*. 1999;
111. Awobajo FO, Olawale OA, Basse S. Changes in blood glucose, lipid profile

- and antioxidant activities in trained and untrained adult male subjects during programmed exercise on the treadmill. *Nig QJ Hosp Med.* 2013;23(2):117–24.
112. Maxwell AJ, Ho HK V., Le CQ, Lin PS, Bernstein D, Cooke JP. L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. *J Appl Physiol.* 2001;90(3):933–8.
 113. McConell GK. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(1):46–51.
 114. Freeman J V., Dewey FE, Hadley DM, Myers J, Froelicher VF. Autonomic Nervous System Interaction With the Cardiovascular System During Exercise. *Prog Cardiovasc Dis.* 2006;48(5):342–62.
 115. Bergman D. The endocrinology of exercise. *Intern Emerg Med.* 2013;8(SUPPL. 1):17–21.
 116. Fahs CA, Heffernan KS, Fernhall B. Hemodynamic and vascular response to resistance exercise with l-arginine. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(4):773–9.
 117. Liu TH, Wu CL, Chiang CW, Lo YW, Tseng HF, Chang CK. No effect of short-term arginine supplementation on nitric oxide production, metabolism and performance in intermittent exercise in athletes. *J Nutr Biochem* 2009;20(6):462–8.
 118. Kemp CD, Conte J V. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Pathol* 2012;21(5):365–71.
 119. Cutrufello PT, Gadomski SJ, Zavorsky GS. The effect of l-citrulline and watermelon juice supplementation on anaerobic and aerobic exercise performance. *J Sports Sci* 2015;33(14):1459–66.
 120. Schaefer A, Piquard F, Geny B, Doutreleau S, Lampert E, Mettauer B, et al. L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. *Int J Sports Med.* 2002;23(6):403–7.
 121. Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW. Ammonia metabolism, the brain and fatigue; Revisiting the link. *Prog Neurobiol.* 2010;91(3):200–19.
 122. Gonzales JU, Raymond A, Ashley J, Kim Y. Does l-citrulline supplementation improve exercise blood flow in older adults? *Exp Physiol.* 2017;102(12):1661–

- 71.
123. Viribay A, Burgos J, Fernández-Landa J, Seco-Calvo J, Mielgo-Ayuso J. Effects of arginine supplementation on athletic performance based on energy metabolism: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2020;12(5):1–20.
 124. Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al. Acute L-arginine supplementation reduces the O₂ cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol*. 2010;109(5):1394–403.
 125. Brandes RP, Fleming I, Busse R. Endothelial aging. *Cardiovasc Res*. 2005;66(2):286–94.
 126. Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniades C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, et al. Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals. *Int J Cardiol*. 2008;126(3):394–9.
 127. Bode-Böger SM, Muke J, Surdacki A, Brabant G, Böger RH, Frölich JC. Oral L-arginine improves endothelial function in healthy individuals older than 70 years. *Vasc Med*. 2003;8(2):77–81.
 128. Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther*. 2008;120(3):333–9.
 129. Van Der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192(12):1731–43.
 130. Goettsch W, Lattmann T, Amann K, Szibor M, Morawietz H, Münter K, et al. Increased expression of endothelin-1 and inducible nitric oxide synthase isoform II in aging arteries in vivo: Implications for atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(3):908–13.
 131. Ungvari Z, Tarantini S, Donato AJ, Galvan V, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging. *Circ Res*. 2018;123(7):849–67.
 132. Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res*. 2000;87(7):540–2.

133. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2004;113(1):8–13.
134. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;105(13):1541–4.
135. Illi B, Colussi C, Rosati J, Spallotta F, Nanni S, Farsetti A, et al. NO points to epigenetics in vascular development. *Cardiovasc Res*. 2011;90(3):447–56.
136. Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch MC, Schofield PM. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol*. 1997;28(7):1796–804.
137. Lekakis JP, Papathanassiou S, Papaioannou TG, Papamichael CM, Zakopoulos N, Kotsis V, et al. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. *Int J Cardiol*. 2002;86(2–3):317–23.
138. O’Brien JT, Thomas A. Vascular dementia. *Lancet*. 2015;386(10004):1698–706.
139. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron* 2013;80(4):844–66.
140. Wang F, Cao Y, Ma L, Pei H, Rausch WD, Li H. Dysfunction of Cerebrovascular Endothelial Cells: Prelude to Vascular Dementia. *Front Aging Neurosci*. 2018;10(November):1–23.
141. Di Marco LY, Venneri A, Farkas E, Evans PC, Marzo A, Frangi AF. Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease - A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol Dis* 2015;82:593–606.
142. Jagtap A, Gawande S, Sharma S. Biomarkers in vascular dementia: A recent update. *Biomarkers Genomic Med* 2015;7(2):43–56.
143. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxidants Redox Signal*. 2008;10(6):1045–59.
144. Bennett S, Grant MM, Aldred S. Oxidative stress in vascular dementia and alzheimer’s disease: A common pathology. *J Alzheimer’s Dis*. 2009;17(2):245–57.

145. Alexopoulos GS. Vascular Disease, Depression, and Dementia. 2003;(Ci):1178–80.
146. Taylor WD, Aizenstein HJ, Alexopoulos GS. The vascular depression hypothesis: Mechanisms linking vascular disease with depression. *Mol Psychiatry*. 2013;18(9):963–74.
147. Villalpando S, Gopal J, Balasubramanyam A, Bandi VP, Guntupalli K, Jahoor F. In vivo arginine production and intravascular nitric oxide synthesis in hypotensive sepsis. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):197–203.
148. Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, Goodwin BL, Eichler DC. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol*. 2003;206(12):2083–7.
149. Hellstrom WJG. Endothelial Dysfunction in Erectile Dysfunction : Role of the Endothelium in Erectile Physiology and Disease. 2003;24(6).
150. Leung AC, Christ G, Melman A. 1. 1998;1–25.
151. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet* 2013;381(9861):153–65.
152. Zou MH, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothel J Endothel Cell Res*. 2004;11(2):89–97.
153. Barassi A, Barassi A, Romanelli MMC, Pezzilli R, Damele CAL, Vaccalluzzo L, et al. Levels of L -arginine and L -citrulline in patients with erectile dysfunction of different etiology. 2017;
154. Musicki B, Burnett AL. Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2007;19(2):129–38.
155. Ingegnoli F, Ughi N, Dinsdale G, Orenti A, Boracchi P, Allanore Y, et al. An international SURvey on non-iNvaSive tecHniques to assess the mIcrocirculation in patients with RayNaud’s phEnomenon (SUNSHINE survey). *Rheumatol Int*. 2017;37(11):1879–90.
156. Chang Rhim H, Kim MS, Park YJ, Choi WS, Park HK, Kim HG, et al. The Potential Role of Arginine Supplements on Erectile Dysfunction: A Systemic Review and Meta-Analysis. *J Sex Med* 2019;16(2):223–34.

157. Rosen RC, Riley A, Wagner G, Osterloh IH, Kirkpatrick J, Mishra A. The international index of erectile function (IIEF): a multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. *Urology* 1997;49(6):822–30.
158. Cormio L, De Siati M, Lorusso F, Selvaggio O, Mirabella L, Sanguedolce F, et al. Oral L-citrulline supplementation improves erection hardness in men with mild erectile dysfunction. *Urology* 2011;77(1):119–22.
159. El Taieb M, Hegazy E, Ibrahim A. Daily Oral L-Arginine Plus Tadalafil in Diabetic Patients with Erectile Dysfunction: A Double-Blinded, Randomized, Controlled Clinical Trial. *J Sex Med.* 2019;16(9):1390–7.
160. Gallo L, Pecoraro S, Sarnacchiaro P, Silvani M, Antonini G. The Daily Therapy With L-Arginine 2,500 mg and Tadalafil 5 mg in Combination and in Monotherapy for the Treatment of Erectile Dysfunction: A Prospective, Randomized Multicentre Study. *Sex Med.* 2020;8(2):178–85.
161. Abu El-Hamd M, Hegazy EM. Comparison of the clinical efficacy of daily use of L-arginine, tadalafil and combined L-arginine with tadalafil in the treatment of elderly patients with erectile dysfunction. *Andrologia.* 2020;52(7):1–6.
162. El-Wakeel LM, Fouad FA, Saleem MD, Saber-Khalaf M. Efficacy and tolerability of sildenafil/l-arginine combination relative to sildenafil alone in patients with organic erectile dysfunction. *Andrology.* 2020;8(1):143–7.
163. Block JA, Sequeira W. Raynaud’s phenomenon. *Lancet.* 2001;357(9273):2042–8.
164. Maricq HR, Carpentier PH, Weinrich MC, Keil JE, Palesch Y, Biro C, et al. Geographic variation in the prevalence of Raynaud’s phenomenon: a 5 region comparison. *J Rheumatol.* 1997;24(5):879–89.
165. Doll DC, Yarbrow JW. Vascular toxicity associated with antineoplastic agents. *Semin Oncol.* 1992;19(5):580–96.
166. Noël B. Pathophysiology and classification of the vibration white finger. *Int Arch Occup Environ Health.* 2000;73(3):150–5.
167. Wigley FM, Flavahan NA. Raynaud’s Phenomenon. *N Engl J Med* 2016 Aug 10;375(6):556–65.

168. Bakst R, Merola JF, Franks AG, Sanchez M. Raynaud's phenomenon: Pathogenesis and management. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(4):633–53.
169. Curtiss P, Schwager Z, Lo Sicco K, Franks AG. The clinical effects of l-arginine and asymmetric dimethylarginine: implications for treatment in secondary Raynaud's phenomenon. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2019;33(3):497–503.
170. Cooke JP, Marshall JM. Mechanisms of Raynaud's disease. *Vasc Med*. 2005;10(4):293–307.
171. Khan F, Litchfield SJ, McLaren M, Veale DJ, Littleford RC, Belch JJF. Oral L-arginine supplementation and cutaneous vascular responses in patients with primary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum*. 1997;40(2):352–7.
172. Herrick AL. The pathogenesis, diagnosis and treatment of Raynaud phenomenon. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(8):469–79.
173. Agostoni A, Marasini B, Biondi ML, Bassani C, Cazzaniga A, Bottasso B, et al. L-Arginine therapy in Raynaud's phenomenon? 1991;202–3.
174. Freedman RR, Girgis R, Mayes MD. Acute effect of nitric oxide on Raynaud's phenomenon in scleroderma. *Lancet*. 1999;354(9180):739.
175. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 2020;16(4):223–37.
176. Onusko E. Diagnosing secondary hypertension. *Am Fam Physician*. 2003;67(1):67–74.
177. Manual S. Mcu 26 / 27 / 28. 1999;(000000).
178. Portugu C. Congresso português de. 2021;
179. Moss MB, Brunini TMC, Soares De Moura R, Novaes Malagris LE, Roberts NB, Ellory JC, et al. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci*. 2004;107(4):391–7.
180. Puar THK, Mok Y, Debajyoti R, Khoo J, How CH, Ng AKH. Secondary hypertension in adults. *Singapore Med J*. 2016;57(5):228–32.
181. Kelm M. The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(1):80–6.

182. Rajapakse NW, Mattson DL. Role of l-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(3):249–55.
183. Facchinetti F, Saade GR, Neri I, Pizzi C, Longo M, Volpe A. L-arginine supplementation in patients with gestational hypertension: A pilot study. *Hypertens Pregnancy*. 2007;26(1):121–30.
184. Palloshi A, Fragasso G, Piatti PM, Monti LD, Setola E, Valsecchi G, et al. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2004;93(7):933–5.
185. Figueroa A, Sanchez-Gonzalez MA, Wong A, Arjmandi BH. Watermelon extract supplementation reduces Ankle blood pressure and carotid augmentation index in obese adults with prehypertension or hypertension. *Am J Hypertens*. 2012;25(6):640–3.
186. Figueroa A, Wong A, Jaime SJ, Gonzales JU. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(1):92–8.
187. Mirenayat MS, Moradi S, Mohammadi H, Rouhani MH. Effect of L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure: a Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(11):10–20.
188. Khalaf D, Krüger M, Wehland M, Infanger M, Grimm D. The effects of oral l-arginine and l-citrulline supplementation on blood pressure. *Nutrients*. 2019;11(7):1–14.
189. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NEP. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(1):142–52.
190. Davis JS, Anstey NM. Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*. 2011;39(2):380–5.
191. Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, Ramsay G, Deutz NE. Sepsis: An arginine deficiency state? *Crit Care Med*. 2004;32(10):2135–45.
192. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NEP. The role of arginine in infection

- and sepsis. *J Parenter Enter Nutr.* 2005;29(SUPPL. 1).
193. Chiarla C, Giovannini I, Siegel JH. Plasma arginine correlations in trauma and sepsis. *Amino Acids.* 2006;30(1):81–6.
 194. Asgeirsson T, Zhang S, Nunoo R, Mascarenas C, Dujovny N, Luchtefeld M, et al. Citrulline: A potential immunomodulator in sepsis. *Surgery.* 2011;150(4):744–51.
 195. Kao CC, Bandi V, Guntupalli KK, Wu M, Castillo L, Jahoor F. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin Sci.* 2009;117(1):23–30.
 196. Wijnands KAP, Castermans TMR, Hommen MPJ, Meesters DM, Poeze M. Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients.* 2015;7(3):1426–63.
 197. Gardiner K. Review Intestinal Amino Acid. 1993;277–83.
 198. Irkebøen KAK, Trand ØAS. J.1399-6576.1999.430307.X.Pdf. 1999;275–88.
 199. Duke T, South M, Stewart A. Activation of the L-arginine nitric oxide pathway in severe sepsis. *Arch Dis Child.* 1997;76(3):203–9.
 200. Kalil AC, Danner RL. L-Arginine supplementation in sepsis: Beneficial or harmful? *Curr Opin Crit Care.* 2006;12(4):303–8.
 201. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2013;17(1):1–8.