



**unopar**

---

**CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO PROFISIONAL EM EXERCÍCIO FÍSICO NA PROMOÇÃO DA SAÚDE**

**JAYME RODRIGUES DIAS JUNIOR**

**SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DESEMPENHO AERÓBICO:  
IMPLICAÇÕES PARA A PRESCRIÇÃO DO TREINAMENTO**

---

Londrina - Paraná  
2015

**JAYME RODRIGUES DIAS JUNIOR**

**SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DESEMPENHO AERÓBICO:  
IMPLICAÇÕES PARA A PRESCRIÇÃO DO TREINAMENTO**

Relatório Técnico apresentado ao Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Unidade Piza, como requisito para a obtenção do título de Mestre Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cosme Franklim Buzzachera

Londrina - Paraná

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,  
PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**Universidade Norte do Paraná**  
**Biblioteca Central**  
**Setor de Tratamento da Informação**

D532s Dias Junior, Jayme Rodrigues

Suplementação de L-arginina e desempenho aeróbico: Implicações  
para a prescrição do treinamento / Jayme Rodrigues Dias Junior.

Londrina [s/n], 2015.

88f.

Relatório Técnico (Mestrado profissional em Exercício Físico na  
Promoção da Saúde). Universidade Norte do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Cosme Franklim Buzzachera

1 – Exercício Físico – Relatório Técnico – UNOPAR 2 – Formação  
Profissional 3 – Condicionamento Físico 4 – Avaliação Física 5 –  
Exercício Físico

I – Buzzachera, Cosme Franklim, orient. II – Universidade Norte do  
Paraná

CDU 611.73

JAYME RODRIGUES DIAS JUNIOR

**SUPLEMENTAÇÃO DE L-ARGININA E DESEMPENHO AERÓBICO:  
IMPLICAÇÕES PARA A PRESCRIÇÃO DO TREINAMENTO**

Relatório Técnico apresentado ao Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Norte do Paraná, referente ao Curso de Mestrado Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde, Área e Concentração Prescrição do Exercício Físico em Idades Jovens, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre Profissional, conferido pela Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Cosme Franklim Buzzachera  
Universidade Norte do Paraná  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Andreo Fernando Aguiar  
Universidade Norte do Paraná  
(Membro Interno)

---

Prof. Dr. Crivaldo Gomes Cardoso Junior  
Universidade Estadual de Londrina  
(Membro Externo)

---

Prof. Dr. Dartagnan Pinto Guedes  
Universidade Norte do Paraná  
Coordenador do Curso

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

## DEDICATÓRIA

*Chegar até aqui não foi fácil, houve muitas dificuldades! Do processo seletivo até a conclusão, os obstáculos que surgiram serviram como aprendizado. O desejo, a dedicação e a determinação superaram todas as dificuldades e hoje a concretização de um sonho...*

*Dedico essa conquista às razões de minha existência “Meu pai Jayme Rodrigues Dias que embora não esteja fisicamente presente entre nós foi alicerce em minha vida com seu exemplo de dignidade, honestidade, e determinação, me ensinou a ser forte e lutar pelo que desejo, à minha mãe Valdirene Aparecida Avancini Dias que desde os primeiros momentos de minha vida cuidou incansavelmente instruindo-me para o exercício da vida”. Pai e Mãe, vocês que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu partilho a alegria desse momento, agradeço todo esforço por me proporcionar uma boa educação. A meu irmão Marcio Rodrigues Dias pelo companheirismo. A minha namorada Simone de Andrade que com um amor especial sempre está ao meu lado em todos os momentos, que durante esses dois anos de Mestrado suportou meus desabafos e crises de estresse principalmente quando os fatos não ocorriam conforme o planejado. A todos amigos que compartilharam seus conhecimentos e experiência durante o curso, ao Prof. Dr. Cosme Franklim Buzzachera, orientador e amigo que além de transmitir conhecimento, me ensinou com seu exemplo de competência e dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor incondicional, sem Ele nada seria.

Aos meus pais Jayme Rodrigues Dias e Valdirene Aparecida Avancini Dias por me ensinarem o caminho da retidão com seus exemplos de vida.

A minha avó Edina Romanin a qual considero minha segunda mãe, obrigado pelo carinho, incentivo e apoio durante o programa de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cosme Franklim Buzzachera, pelo seu exemplo de dedicação, comprometimento e competência me ensinou o incansável ato de buscar o conhecimento, e que a ciência requer dedicação.

Ao Professor Dr. Rubens Alexandre da Silva Junior e ao Doutorando Márcio Rogério de Oliveira, os quais compartilharam conhecimentos e experiências, ensinando-me os procedimentos para realização de eletromiografia para o desenvolvimento da pesquisa que compõe parte desse relatório técnico.

Aos voluntários que aceitaram a participar do estudo, dedicando um tempo para realização dos testes.

Ao Ailton Rodrigues, padraсто e amigo, que inúmeras vezes me ajudou durante minha formação no curso de Mestrado, sem a sua ajuda chegar até aqui seria um pouco mais difícil.

A minha namorada Simone de Andrade Evangelista, companheira de todas as horas, que partilhou comigo durante dois anos momentos de alegria, de dificuldades e de preocupação fortalecendo-me com gestos e palavras motivadoras.

Ao grande amigo irmão Carlos Henrique de Souza pelo companheirismo durante o programa de mestrado e por ter me acolhido em sua clínica durante o período de aula e de coletas de dados.

A todos meus amigos (as), do mestrado que fizeram da sala de aula uma grande família, contribuindo para que pequenos instantes se transformassem em grandes momentos compartilhando amizade conhecimento e experiência.

Aos meus colegas de trabalho que me deram apoio e incentivo e inúmeras vezes colaboraram em ajustes de horário para que eu pudesse cumprir com os requisitos do Programa de Mestrado, não citarei nomes para não me esquecer de ninguém, mas expresso minha gratidão a todos.

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”*

*(Leonardo da Vinci)*

DIAS JR, Jayme Rodrigues. **Suplementação de L-Arginina & Desempenho Aeróbico: Implicações para a Prescrição do Treinamento**. 80f. Relatório Técnico. Mestrado Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde. Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde. Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

## RESUMO

O propósito do presente relatório técnico foi elaborar um Guia Prático sobre os efeitos da administração oral do aminoácido precursor do óxido nítrico, L-arginina, sobre a capacidade de realizar exercício físico aeróbico em humanos. Tal proposta é direcionada para profissionais da saúde que prestam serviços de avaliação física, orientação nutricional e prescrição do treinamento, possibilitando uma informação atualizada sobre o papel de precursores do óxido nítrico nas respostas metabólicas, hemodinâmicas, respiratórias e musculares associadas com o exercício físico aeróbico. Tal proposta é ainda direcionada para acadêmicos da área da saúde, como um referencial na formação de recursos humanos em cursos universitários e delineamento de estudos científicos. Para suportar tais propostas, o relatório técnico inclui ainda um artigo científico, intitulado ‘adjustments of pulmonary O<sub>2</sub> uptake and muscle deoxygenation during incremental ramp exercise in young adults: influence of acute l-arginine supplementation’, submetido ao European Journal of Applied Physiology. Especificamente em referência ao Guia Prático, dividiu-se a sua elaboração em três etapas: revisão sistemática do conteúdo de interesse, definição de tópicos a serem abordados no material, e processo de criação, diagramação e arte final, realizada por um profissional de design gráfico. Após aprovação pela banca examinadora, a versão final do Guia Prático elaborado neste relatório técnico será submetida ao processo de avaliação editorial, essencial para o pedido do International Standard Book Number (ISBN), com a posterior divulgação do material. Logo, o presente relatório técnico, com a elaboração do Guia Prático e produção do manuscrito científico, busca atender as premissas e características peculiares do curso de Mestrado Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde da Universidade Norte do Paraná.

**Palavras-chave:** Formação Profissional, Condicionamento Físico, Avaliação Física, Exercício Físico.



DIAS JR, Jayme Rodrigues. **L-Arginine Supplementation & Aerobic Performance: Considerations for Training Prescription.** 80f. Technical Report. Professional Master's in Exercise in Health Promotion. Research Center on Health Sciences. North University of Paraná, Londrina, 2015.

## **ABSTRACT**

The primary aim of this technical report was to develop a practical guide on the acute and chronic effects of L-arginine supplementation on aerobic exercise performance. This technical report was created to help sport and health professionals who are responsible for fitness assessment and nutritional and/or training prescriptions, and can stimulate more evidence-based decisions and the use of up-to-date information by these professionals. This technical report can also provide simple and practical, but not empirical, information to future sport and health professionals on how nitric oxide precursors, such as L-arginine, affects cardiorespiratory, metabolic, and muscle responses during aerobic exercise. A research paper, entitled 'adjustments of pulmonary O<sub>2</sub> uptake and muscle deoxygenation during incremental ramp exercise in young adults: influence of acute L-arginine supplementation', submitted to European Journal of Applied Physiology, was inserted to reinforce the more scientific approach of this report. With respect to practical guide, their development occurred in three parts: systematic review of the content, definition of the topics of interest, and final creation by an art designer. After the approval by the examination committee, the final version of the practical guide developed by this technical report will be submitted to approval for an editorial committee, crucial for the solicitation of the International Standard Book Number (ISBN). This technical report, which includes development of a practical guide and production of a scientific manuscript, is in agreement with the assumptions and rules proposed by the course of Professional Master's in Exercise in Health Promotion.

**Keywords:** Practical Guide, Sport Performance, Competition, Athlete.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Formação do óxido nítrico .....	13
<b>Figura 2</b>	Estrutura química do ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico .....	14
<b>Figura 3</b>	Metabolismo da L-arginina .....	15

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Fontes alimentares de l-arginina .....	18
<b>Tabela 2</b>	Efeitos agudos da suplementação de l-arginina em humanos .....	20
<b>Tabela 3</b>	Efeitos crônicos da suplementação de l-arginina em humanos .....	22

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
EPÍGRAFE .....	iii
RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
3.1 A MOLÉCULA GASOSA ÓXIDO NÍTRICO .....	12
3.2 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: METABOLISMO .....	13
3.3 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: MECANISMOS DE AÇÃO .....	15
3.4 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: EFEITOS ADVERSOS .....	17
<b>4. DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>19</b>
4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA .....	19
4.2 DEFINIÇÃO DE TÓPICOS .....	25
4.3 ARTE FINAL E SOLICITAÇÃO DO ISBN .....	26
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>27</b>
<b>6. APÊNDICE A: Guia Prático .....</b>	<b>33</b>
<b>7. APÊNDICE A: Manuscrito Científico .....</b>	<b>53</b>
<b>8. APÊNDICE A: Resumo Científico .....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o US Dietary Supplement Health and Education Act (1994), pode-se definir suplementos alimentares como ‘substâncias ingeridas via oral que incluem produtos de origem botânica (p.ex., ervas medicinais) e não botânica (p.ex., minerais, metaloides, aminoácidos, vitaminas, entre outros) elaborados com o propósito de manutenção ou melhoria da estrutura e funcionalidade’. Estima-se que cerca de \$30 bilhões anuais são gastos pela população americana na comercialização de suplementos alimentares (Bailey et al, 2013), confirmando o progressivo crescimento da indústria dos recursos ergogênicos nutricionais nos últimos anos (Eisenberg et al, 1998; Tekin e Kravitz, 2004). Entretanto, o crescente aumento deste setor industrial tem sido monitorado por agências reguladoras federais, pois um maior número de eventos adversos à saúde associados ao uso de suplementos alimentares tem sido reportado no período (Palmer et al, 2003). Convencidos pelos apelos mercadológicos de ‘melhoria do desempenho físico’, atletas e praticantes de exercício físico são reconhecidamente os principais consumidores destes produtos (Massad et al, 1995; Krumbach et al, 1999; Froiland et al, 2004). De fato, em um estudo anterior, Froiland et al (2004) notaram que 89% dos atletas colegiais entrevistados na pesquisa faziam o uso de suplementos nutricionais visando melhorias na saúde ou no desempenho físico. Apesar da prevalência elevada no uso destes produtos pelos jovens, os resultados deste estudo tornam-se ainda mais relevantes na medida em que os entrevistados citam as suas principais fontes de informação para a decisão do uso (ou não) de suplementos nutricionais: família, vendedores, atletas veteranos, amigos e treinadores. Logo, torna-se lógico especular que o baixo (ou falta de) conhecimento baseado em evidências aumenta ainda mais a susceptibilidade de jovens aos eventos adversos à saúde associados ao uso inadequado de suplementos nutricionais.

O aminoácido semiessencial L-arginina foi um dos últimos recursos ergogênicos a serem inseridos no crescente mercado de suplementos nutricionais. Entretanto, um considerável

número de atletas relata usar regularmente a L-arginina para fins ergogênicos (Malinauskas et al 2007). Embora o aminoácido atue em diversas vias metabólicas no corpo humano, sua função primária relaciona-se com a produção de óxido nítrico através da ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), encontradas sob diferentes isoformas em numerosos tecidos corporais (Ignarro, 1999). As enzimas NOS convertem a L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico na presença de cofatores (Stamler e Meissner, 2001), regulando assim funções vitais como vasodilatação, fluxo sanguíneo, respiração e biogênese mitocondrial, e inibição da formação plaquetária. Portanto, devido a tais funções, a administração exógena de L-arginina poderia contribuir na redução do risco de disfunções endoteliais (Fagard, 2002) e talvez na melhoria da capacidade para realizar exercício físico (Bailey et al., 2010). Contudo, evidências recentes indicam que a suplementação exógena de L-arginina poderia não influenciar tanto a disfunção endotelial como a capacidade de exercício físico (Alvares et al., 2011; Bescos et al, 2012). Embora as razões para tais achados não sejam conhecidas, supõe-se que tais controvérsias podem ter sido originadas por diferenças em termos de dosagens, pureza, e procedimentos de uso do produto, características inerentes dos participantes, entre outros.

## **2 OBJETIVOS**

O presente relatório técnico buscou elaborar um Guia Prático sobre os efeitos da administração oral da L-arginina sobre a capacidade de realizar exercício físico aeróbico em adultos jovens e saudáveis. Tal instrumento será direcionado para profissionais da saúde que prestam serviços de avaliação física, prescrição de exercício físico, orientações nutricionais, possibilitando uma informação atualizada e baseada em evidências sobre o uso seguro e eficiente do aminoácido precursor do óxido nítrico L-arginina no contexto do exercício físico em humanos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A MOLÉCULA GASOSA ÓXIDO NÍTRICO

O monóxido de nitrogênio, ou óxido nítrico, é uma molécula gasosa com baixo peso molecular, simples de um ponto de vista estrutural, e presente na poluição atmosférica como um composto tóxico. Entretanto, desde a sua descoberta em tecidos biológicos em meados da década de 80, o óxido nítrico têm sido alvo de diversas pesquisas na área da fisiologia e farmacologia (Ignarro et al, 1999), sendo reconhecido pela revista Science como a Molécula do Ano de 1992 (Koshland, 1992). Por sua descoberta, três pesquisadores americanos, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, e Ferid Murad, foram nomeados para receber o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1998. Evidências indicam que essa molécula volátil é produzida em diversos locais no corpo humano, sendo responsável por inúmeras funções vitais na regulação da vasodilatação, fluxo sanguíneo, respiração celular e biogênese mitocondrial, e inibição plaquetária. O óxido nítrico pode ser sintetizado por duas vias de sinalização: uma via dependente da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e outra via independente da NOS. Na via dependente da NOS, o aminoácido L-arginina é oxidado para óxido nítrico pela ação das enzimas NOS. Além disso, a L-citrulina pode ser convertida para L-arginina, sendo um doador secundário de óxido nítrico na via dependente da NOS (Ignarro et al, 1999; Stamler e Meissner, 2001). Na via independente do NOS, por outro lado, o óxido nítrico é formado pela conversão de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (Govoni et al, 2008) (FIG. 1).

Neste contexto, diversos agentes farmacológicos e nutricionais, precursores do óxido nítrico por vias dependente ou independente do NOS, foram desenvolvidos nos últimos anos (Bescos et al, 2012), sendo que alguns deles poderiam ter efeitos ergogênicos associados com o exercício físico (Alvares et al, 2011; Jones, 2014). Evidências indicam que tal melhoria na capacidade de realizar exercício físico via ingestão de precursores de óxido nítrico pode estar associada com mudanças no fluxo sanguíneo em nível micro- e macrovascular e/ou na respiração mitocondrial

(Bloomer, 2010; Bescos, 2012) ou na recuperação muscular pós esforço através de uma maior hiperemia (Rector et al, 1996). Portanto, tais agentes farmacológicos e nutricionais precursores do óxido nítrico são vendidos no mercado com o apelo de melhorar o desempenho físico, retardando a fadiga muscular, e acelerando a recuperação tecidual em adultos jovens, saudáveis, ou pacientes portadores de condições crônicas degenerativas.

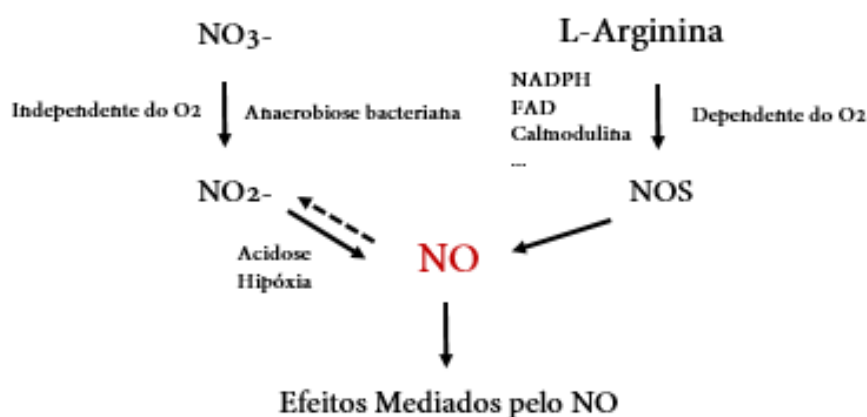


FIG. 1. Formação do óxido nítrico.  $\text{NO}_3^-$  nitrato;  $\text{NO}_2^-$  nitrito; NO óxido nítrico; FAD flavina adenina dinucleotídeo; NADPH nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (adaptado de Jones, 2014).

### 3.2 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: METABOLISMO

A L-arginina, ou ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico, é um aminoácido semiessencial com a habilidade de tornar-se essencial em condições especiais (Morris Jr, 2006). Composto por seis átomos de carbono, quatro átomos de nitrogênio, dois átomos de oxigênio, e quatorze átomos de hidrogênio, a L-arginina têm sido um dos últimos recursos ergogênicos a serem comercializados no crescente mercado de suplementos nutricionais. Apesar disso, um estudo recente conduzido por Malinauskas et al (2007) reportou que um considerável número de atletas da South Eastern State University faz o uso regular de L-arginina com propósitos ergogênicos. Embora nenhum



estudo tenha sido conduzido em centros de condicionamento físico para examinar a prevalência do uso de suplementação com L-arginina em adultos jovens e saudáveis, especula-se que um número considerável de praticantes faz a ingestão exógena regular da substância (Bloomer et al, 2010) (FIG. 2).

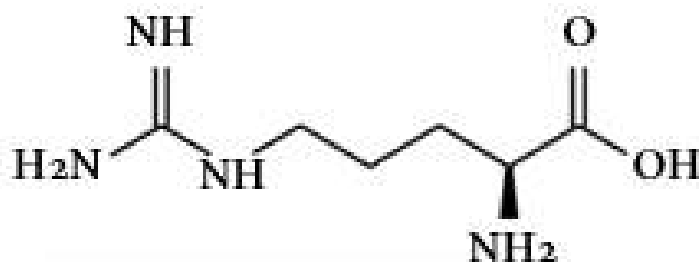


FIG. 2. Estrutura química do ácido 2-amino-5-guanidino-pentanoico. N nitrogênio; O oxigênio; H Hidrogênio (adaptado de Dweik, 2007).

De modo específico, a L-arginina tem um papel primordial em numerosas vias metabólicas no corpo humano. A conversão da L-arginina em L-ornitina e ureia, por exemplo, é crucial para a remoção de compostos nitrogenados tóxicos ao organismo. Além disso, a L-arginina atua de modo importante na produção de óxido nítrico pela ação de enzimas NOS encontradas em diversos tecidos humanos sob diferentes isoformas, sendo duas constitutivas, NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), e uma indutiva (iNOS) associado ao sistema imunitário (Ignarro, 1999; Bogdan et al, 2000). Essas enzimas catalisam a reação de conversão da L-arginina em coprodutos L-citrulina e óxido nítrico na presença de cofatores específicos (Stamler e Meissner, 2001) em tecidos diversos como a musculatura esquelética (FIG.3). De fato, estudos recentes demonstram que ambos, nNOS e eNOS, podem ser encontradas no tecido muscular humano (Nakane et al, 1993; Frandsen et al, 1996). Os mecanismos de ação da L-arginina nos tecidos humanos, incluindo a musculatura esquelética, serão abordados no tópico a seguir.

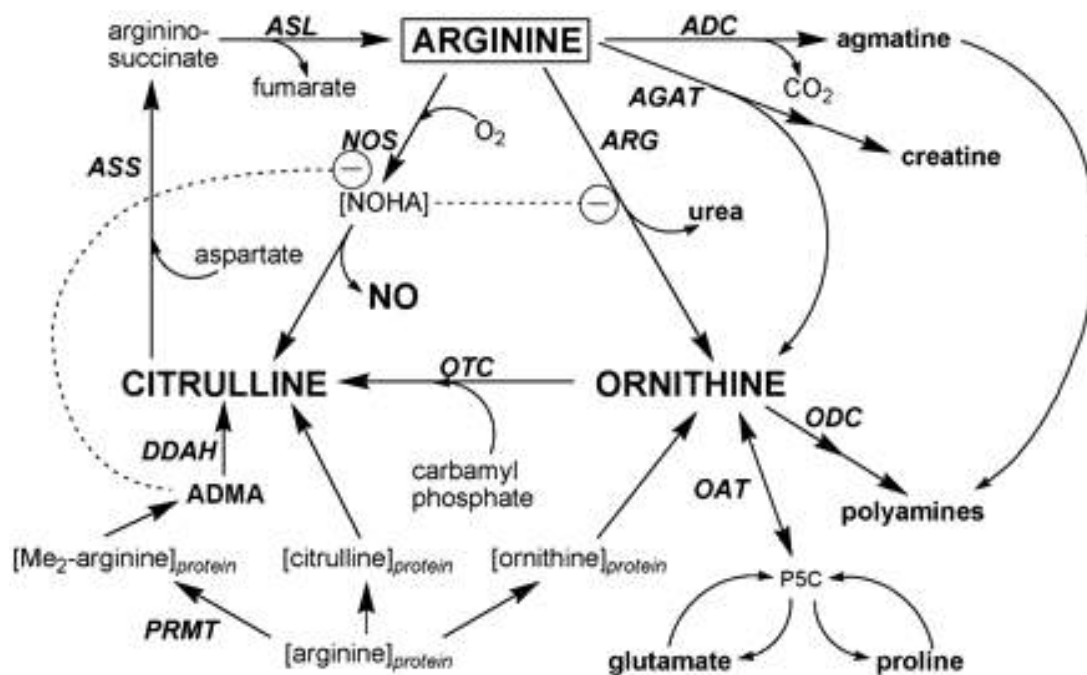


FIG. 3. Metabolismo da L-arginina (Morris Jr, 2006).

Torna-se importante ressaltar que uma vez assimilada pelo trato digestivo, 60% da L-arginina entra na circulação hepática, sendo o restante metabolizado pelo intestino (Wu e Morris Jr, 1998). Uma porção substancial de L-arginina que consegue entrar na circulação hepática acaba sendo rapidamente catabolizada por enzimas arginases, responsáveis pela conversão da arginina livre em ureia e ornitina. Portanto, a biodisponibilidade de L-arginina parece ser reduzida em humanos (Waugh et al, 2001).

### 3.3 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: MECANISMOS DE AÇÃO

Conforme citado anteriormente, estudos anteriores demonstram que ambos, nNOS e eNOS, podem ser detectadas no tecido muscular humano (Nakane et al 1993; Frandsen et al 1996). Embora seus efeitos na musculatura esquelética não sejam claros, sabe-se que uma aumentada produção de óxido nítrico no tecido poderia estar associada com melhorias na produção de força e potência (Morrison et al, 1996), síntese proteica e ativação de células satélites (Anderson

2000; Sellman et al 2006) e biogênese mitocondrial (Nisoli et al, 2003). Entretanto, talvez a mais notável função associada ao óxido nítrico diz respeito a vasorregulação. Uma reduzida vasodilatação dependente do endotélio, por exemplo, tem sido reconhecida como um fator determinante para o diminuído fluxo sanguíneo microvascular em sedentários, idosos, ou pacientes portadores de condições crônicas degenerativas (DeSouza et al, 2000; Muller-Delp et al, 2002). Em um estudo com modelos animais, Muller-Delp et al. (2002) notaram que uma vasodilatação dependente do endotélio é reduzida nas artérias e arteríolas do músculo oxidativo sóleo em ratos velhos, mas não em ratos novos, sugerindo uma diminuída distribuição do fluxo sanguíneo local. Por outro lado, Hirai et al (2012) mostraram que uma reduzida vasodilatação dependente do endotélio poderia ser encontrada mesmo em ratos novos, porém sedentários, sugerindo que o reduzido fluxo sanguíneo microvascular ocorre de modo independente a idade. Apesar dos resultados contraditórios, ambos os estudos concordam que uma reduzida resposta vasodilatadora pode ser causada pela diminuída biodisponibilidade e ação da via de sinalização óxido nítrico, guanosina monofosfato cíclica (cGMP), proteína quinase dependente do cGMP (PKG1) (Taddei et al, 2000; Hirai et al, 2011). Perturbações na via de sinalização celular óxido nítrico/GMPc/PKG1 podem contribuir, por exemplo, no deterioramento de funções endoteliais (Vallance e Chan, 2001). Logo, intervenções farmacológicas e não farmacológicas realizadas com o escopo de melhorar a resposta vasodilatadora endotelial pela maior biodisponibilidade e ação da via de sinalização óxido nítrico/cGMP/PKG1, poderiam ser eficazes na prevenção e tratamento de disfunções endoteliais.

Com base nas informações acima, pode-se especular que a suplementação dietética com L-arginina, um aminoácido precursor da NOS (Moncada e Higgs, 1993), seria uma estratégia não farmacológica capaz de afetar a biodisponibilidade e ação da via de sinalização celular óxido nítrico/cGMP/PKG1. De fato, estudos *in vivo* usando a suplementação dietética com L-arginina tem confirmado uma melhora na regulação endotelial de pacientes em risco para desenvolver aterosclerose (Clarkson et al, 1996; Lerman et al, 1998), possivelmente através de mecanismos

fisiológicos associados com a aumentada produção de óxido nítrico. Portanto, a suplementação dietética de L-arginina tem sido recomendada para pacientes portadores de fatores de risco para a aterosclerose (Clarkson et al, 1996), em adição a ingestão cotidiana de L-arginina. Em uma dieta típica, cerca de 4–5 g L-arginina são consumidas diariamente através de alimentos, tais como castanha do Pará, semente de girassol, amêndoas, carne, derivados do leite, entre outros (King et al, 2008) (TABELA 1); porém, a L-arginina poderia ser ainda sintetizada de modo endógeno nos rins e fígado (Boger e Bode-Boger, 2001), e uma concentração plasmática de L-arginina entre 70 e 115  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  tem sido reportada em humanos (Boger et al 2008). Em adultos saudáveis, por outro lado, a suplementação dietética de L-arginina parece não afetar a produção de óxido nítrico e biodisponibilidade e ação da via de sinalização óxido nítrico/cGMP/PKGI (Bode-Boger et al, 1998). Tal fenômeno poderia estar associado ao chamado ‘paradoxo da L-arginina’, onde concentrações plasmáticas de L-arginina são elevadas o bastante para saturar enzimas NOS, não promovendo aumentos adicionais na atividade enzimática; portanto, a idéia de que a concentração de um substrato é responsável pela velocidade de reação catalisada por uma enzima é desafiada. De modo interessante, os achados que relacionaram suplementação alimentar de L-arginina com exercício físico são contraditórios em adultos saudáveis (Alvares et al, 2011), apesar dos efeitos atenuados da substância sobre a produção de óxido nítrico pela ação das enzimas NOS.

### 3.4 O AMINOÁCIDO L-ARGININA: EFEITOS ADVERSOS

Embora um ‘suplemento alimentar’ tenha efeitos positivos sobre a saúde e desempenho físico, o conhecimento dos efeitos colaterais associados ao uso da substância deve ser reportado na literatura (Palmer et al, 2003). Por exemplo, a suplementação dietética com L-arginina, oral ou intravenosa, tem sido associada com distúrbios gastrointestinais, como náusea, vômito e diarreia (Grimble, 2007). Embora uma enorme variabilidade individual tenha sido associada com a suplementação aguda ou crônica de L-arginina, doses inferiores a 20 g parecem ser toleradas em adultos saudáveis. De fato, em um estudo realizado por Evans et al (2004) usando quatro

diferentes doses de L-arginina pura (3, 9, 21, e 30g/dia) durante uma (01) semana, um efeito progressivo foi verificado com o aumento da dose ingerida e a presença de eventos adversos, incluindo sangramento nasal, náusea, vômitos, e diarreia. Tais achados foram confirmados por outro estudo, publicado por Campbell et al (2006), usando doses elevadas (12g L-arginina) durante oito semanas. Porém, outros efeitos colaterais associados com a ingestão excessiva de L-arginina, como uma maior probabilidade de morte na reabilitação pós-infarto do miocárdio (Schulman et al, 2006) ou mesmo anafilaxia (Tiwary et al, 1973), não foram comprovados na literatura científica (Bednarz et al, 2005; Katan et al, 2009).

TABELA 1. Fontes alimentares de L-arginina (De Lorgeril, 1998).

<b>Item Alimentar</b>	<b>Conteúdo Arginina (g/100g)</b>
Semente de Soja	2400
Semente de Girassol	1995
Castanha do Pará	1834
Carne Bovina	1831
Carne Suína	1684
Carne de Frango	1410
Salmão	1280
Ovos	749
Espinafre	324
Pão Branco	308

## 4 DESENVOLVIMENTO

O Guia Prático (APÊNDICE A) apresentado no presente relatório técnico foi elaborado em três etapas: revisão sistemática do conteúdo de interesse, definição dos tópicos a serem abordados no material, e processo de criação, diagramação e arte final realizada por um profissional de design gráfico.

### 4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

O presente tópico foi elaborado com o propósito de fornecer informações científicas atualizadas e baseadas em evidências sobre os efeitos da suplementação aguda e crônica de L-arginina sobre o desempenho físico aeróbico. Para o processo de seleção de artigos científicos foram utilizados os seguintes descritores da *Medical Subject Headings* (MeSH – Medline) em língua inglesa: *Arginine* (Arginina), *Exercise* (Exercício Físico), *Athletic Performance* (Desempenho Físico), e *Aerobic Exercise* (Exercício Físico Aeróbico), na base de dados PubMed ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)). O descritor *Arginine* foi combinado com os outros três descritores (ou seja *Arginine + Exercise*, *Arginine + Athletic Performance*, *Arginine + Aerobic Exercise*), utilizando-se o operador AND. O período considerado para a busca foi de 1994 até 2014.

No processo de busca literária, foram identificados 1354 artigos científicos para as combinações *Arginine + Exercise* e *Arginine + Aerobic Exercise*, e somente 121 estudos para a combinação *Arginine + Athletic Performance*. Os critérios para inclusão dos artigos científicos foram: (1) estudos originais publicados em periódicos com processo de revisão por pares; (2) estudos avaliando os efeitos da suplementação de L-arginina no desempenho físico aeróbico; (3) estudos com humanos, sem quaisquer condições patológicas ou com participantes > 60 anos; e por fim (4) estudos com metodologia e procedimentos estatísticos adequados. Neste contexto, 18 artigos científicos foram selecionados para a revisão sistemática a ser inserida no Guia Prático.

A TABELA 2 apresenta os efeitos agudos da suplementação de L-arginina sobre o desempenho físico aeróbico. No total de 07 estudos selecionados, verificou-se que em apenas 04 o uso de L-arginina pura foi realizado (Bescos et al, 2009; Koppo et al, 2009; Forbes et al, 2014; Yavuz et al, 2014); outros estudos fizeram o uso de componentes extras para combinação como: aspartato (Burtscher et al, 2005), antioxidantes (Chen et al, 2010), e glicina + ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico (GAKIC; Buford e Koch, 2003). Em referência ao parâmetro usado na avaliação, 03 estudos examinaram indicadores de aptidão aeróbica enquanto 03 artigos investigaram desempenho físico aeróbico. Apenas 02 estudos mensuraram biomarcadores de óxido nítrico (Bescos et al, 2009; Koppo et al, 2009).

A TABELA 3 apresenta os efeitos crônicos da suplementação de L-arginina no desempenho físico aeróbico. No total de 11 estudos selecionados, verificou-se que em apenas 05 o uso de L-arginina pura foi realizado (Shaefer et al, 2002, Sunderland et al, 2011; Vanhatalo et al, 2013; Alvares et al, 2014; DaSilva et al, 2014); outros estudos fizeram o uso de componentes extras na combinação, como: aspartato (Abel et al, 2004), glutarato (Campbell et al, 2006), extrato de semente de uva (Camic et al, 2010), e carboidratos + vitaminas (Bailey et al, 2010). Apenas 02 estudos mensuraram biomarcadores de óxido nítrico (Bailey et al, 2010; Vanhatalo et al, 2013).

Conforme citado anteriormente, a conversão da L-arginina para L-citrulina e óxido nítrico pode afetar numerosas funções associadas com a aumentada capacidade para realizar exercício físico, tais como vasodilatação, hiperemia micro e macrovascular, biogênese mitocondrial e respiração celular (Stamler e Meissner, 2001). Na presente revisão, verificou-se que os achados de estudos associando suplementação exógena de L-arginina e desempenho aeróbico são contraditórios e pouco promissores em adultos, confirmando uma hipótese recente de Alvares et al (2011). De fato, em um recente estudo, Bailey et al (2010) notaram que a ingestão exógena de L-arginina (6 g/dia) combinada com aminoácidos e vitaminas foi capaz de aumentar a tolerância (L-arginina  $707 \pm 232$  vs placebo  $562 \pm 145$  s;  $P < 0.05$ ) e eficiência (L-arginina  $1.48 \pm 0.12$  L/min<sup>-1</sup> vs

placebo  $1.59 \pm 0.14$  L/min;  $P < 0.05$ ) durante um teste incremental máximo em ciclo ergômetro. Uma maior concentração de  $\text{NO}_2^-$  plasmático foi ainda revelado. Embora os resultados pareçam promissores, duas limitações metodológicas importantes merecem ser destacadas: a primeira diz respeito a falta de mensuração da concentração de  $\text{NO}_2^-$  plasmático antes da ingestão oral de L-arginina, sendo medida somente 60 min pós ingestão, negligenciando assim possíveis diferenças basais na medida; a segunda, por sua vez, refere-se a combinação com precursores adicionais do óxido nítrico com a L-arginina, como a L-citrulina (Sureda et al, 2009; Hickner et al, 2006) e o suco de beterraba concentrado (Bailey et al, 2009; Lansley et al, 2011; Ferguson et al, 2013). Para superar tais limitações, Vanhatalo et al (2013) repetiram o estudo de Bailey (2010), usando uma suplementação aguda de 6 g L-arginina pura ou 6 g L-arginina combinada com 25 g de carboidratos, uma vez que a captação de L-arginina poderia ser dependente da insulina (Broglia et al, 2003). Conforme especulado, ambos os procedimentos de ingestão da L-arginina (pura ou adicionada a carboidratos) foram incapazes de aumentar a produção de óxido nítrico, eficiência, e tolerância ao exercício físico em adultos jovens e saudáveis. Em concordância com os achados supracitados, Abel et al (2004) mostraram que a ingestão de L-arginina pura ( $\sim 6$  g/dia  $\times$  4 sem) não afetou a tolerância ao exercício físico em ciclistas treinados. Ainda, nenhuma diferença na concentração plasmática de lactato, amônia, e hormônios foi verificada entre os grupos, contrastando os achados de Schaefer et al (2002), os quais indicaram reduções importantes nas concentrações plasmáticas de lactato e amônia após infusão de 3 g L-arginina durante exercício físico incremental. A maior biodisponibilidade da L-arginina causada pela infusão intravenosa pode ter contribuído para tais achados controversos, pois a disponibilidade da L-arginina via ingestão oral é de apenas  $\sim 60\%$  devido a ação de enzimas arginases no tecido hepático (Bode-Boger et al, 1998).



TABELA 2. Efeitos agudos da suplementação de L-arginina em homens saudáveis

Estudo (Ano)	Amostra	Protocolo do Teste	Administração (Oral ou Intravenosa) (Outros compostos)	Mensuração de NO (Efeito)	Resultados
Bescos et al (2009)	N = 9 Atletas de tênis	Teste gradual em esteira até 90% VO <sub>2máx</sub>	D1 L-arginina 5.0g/d D2 L-arginina 9.0g/d D3 L-arginina 20.0g/d (Oral)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (sem efeito)	↓ [lactato] plasma = respostas respiratórias
Koppo et al (2009)	N = 7 Fisicamente ativos	2 × tiros ciclo ergômetro 80% LV + pausa de 12 min	L-arginina 7.2g/d (Oral)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (sem efeito)	Acelera cinética do VO <sub>2</sub> (12%) = [lactato] plasma
Chen et al (2010)	N = 16 Atletas de ciclismo	Teste submáximo em ciclo ergômetro, 60% VO <sub>2máx</sub>	L-arginina 5.2g/d (Oral) (Antioxidantes)	-	↑ limiar aeróbio (16.7%) Sem efeito no VO <sub>2max</sub>
Burtscher et al (2005)	N = 16 Fisicamente ativos	Teste submáximo gradual 50W + 50W/3min até 150W	L-arginina 3.0g/d (Oral) (Aspartato)	-	↓ [lactato] plasma ↑ capacidade e tolerância ao trabalho
Buford e Koch (2003)	N = 10 Indivíduos não ativos	Teste Wingate repetido Ciclo ergômetro	L-arginina 3.0g/d (Oral) (GAKIC)	-	↓ índice de fadiga = [lactato] plasma

Estudo (Ano)	Amostra	Protocolo do Teste	Administração (Oral ou Intravenosa) (Outros compostos)	Mensuração de NO (Efeito)	Resultados
Forbes (2014)	N = 15 Corredores treinados	Teste submáximo em ciclo ergômetro, 80%LV	L-arginina 7.5g (Oral)	-	= tempo até exaustão = [lactato] plasma = Hormônios
Yavuz et al. 2014	Atletas de luta livre (N=9) idade média – 25 anos.	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão.	L-arginina 1.5g/d (Oral)	-	= [lactato] plasma ou VO <sub>2max</sub> ↑ tempo até exaustão (5.8%)

TABELA 3. Efeitos crônicos da suplementação de L-arginina em homens saudáveis

Estudo (Ano)	Amostra	Protocolo do Teste	Administração (Oral ou Intravenosa) (Outros compostos)	Mensuração de NO (Efeito)	Resultados
Bailey et al (2010)	N = 9 Fisicamente ativos	Teste submáximo e máximo em ciclo ergômetro	L-arginina 6.0g/d (Oral 4-5 sem) (CHO + vitaminas)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Aumento)	↓ PAS ↓ custo de O <sub>2</sub> ↓ Amplitude O <sub>2</sub> ↑ tempo até a exaustão
Vanhatalo et al (2013)	N = 18 Fisicamente ativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão	L-arginina 6.0g/d (Oral 5-6 sem)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (Sem efeito)	↓ PAS repouso Sem efeitos adicionais
Camic et al (2010a)	N = 41 Fisicamente inativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão	L-arginina 3.0g/d (Oral 4 sem) (PEG)	-	↑ limiar ventilatório Sem efeito no VO <sub>2max</sub>
Camic et al (2010b)	N = 50 Fisicamente ativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão	G1 L-arginina 1.5g/d G2 L-arginina 3.0g/d (Oral 4 sem) (PEG)	-	= [lactato] plasma ↑ capacidade de trabalho
Abel et al (2004)	N = 30 Atletas Endurance	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão	G1 L-arginina 2.8g/d G2 L-arginina 5.7g/d (Oral 4 sem) (Aspartato)	-	Sem efeito metabólico ou endócrino Sem efeito no VO <sub>2max</sub>

Estudo (Ano)	Amostra	Protocolo do Teste	Administração (Oral ou Intravenosa) (Outros compostos)	Mensuração de NO (Efeito)	Resultados
Sunderland et al (2011)	N = 18 Atletas Endurance	Teste submáximo e máximo em ciclo ergômetro	L-arginina 12.0g/d (Oral 4 sem)	-	= LV = VO <sub>2max</sub>
Schaefer et al (2002)	N = 8 Fisicamente ativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão	L-arginina 3.0g/d (Intravenosa 4 sem)	-	↓ [lactato] e [amônio] plasma ↓ VO <sub>2</sub> e VCO <sub>2</sub>
Campbell et al (2006)	N = 35 Fisicamente inativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão Teste de Wingate	L-arginina 6.0g/d (Oral 8 sem) (Glutarato)	-	↑ potência pico ↑ VO <sub>2max</sub>
Campbell et al (2006)	N = 35 Fisicamente inativos	Teste incremental em ciclo ergômetro até exaustão Teste de Wingate	L-arginina 6.0g/d (Oral 8 sem) (Glutarato)	-	↑ potência pico ↑ VO <sub>2max</sub>
Alvares et al (2014)	N = 15 Corredores treinados	Teste 5 km time trial	L-arginina 6.0g/d (Oral 4 sem) (Glutarato)	-	= Tempo 5km corrida = Hormônios
DaSilva et al (2006)	N = 15 Corredores treinados	Teste 5 km time trial	L-arginina 6.0g/d (Oral 4 sem) (Glutarato)	-	= Tempo 5km corrida = Hormônios ↑ GH e cortisol

Alguns dos poucos efeitos benéficos associados com a suplementação dietética de L-arginina podem ser causadas por vias independentes do óxido nítrico ou por ingredientes presentes nos compostos de L-arginina (Bescos et al, 2012). Por exemplo, Buford e Koch (2004) notaram melhorias na potência média durante uma série de cinco *sprints* de 10 s com 1 min de intervalo entre séries em ciclo ergômetro após a ingestão de uma mistura composta por 6 g L-arginina combinada com 2 g glicina e 3.2 g ácido á cetoisocaproico, conhecida como GAKIC. Porém, sabe-se que combinar L-arginina com glutamato e aspartato é efetivo para reduzir concentrações plasmática de amônia (Denis et al, 1991) e lactato (Schaefer et al, 2002), podendo contribuir para os resultados de Buford e Koch (2004). Ainda, especula-se que tais melhorias poderiam associar-se com um aumento na concentração de PCr intramuscular via L-arginina (Minuskin et al 1981). Em resumo, as evidências indicam que a administração aguda, oral ou intravenosa, de L-arginina, pura ou combinada, poderiam ter pouco ou nenhum efeito sobre a capacidade de realizar exercício físico aeróbico em adultos saudáveis.

Recentes evidências indicam ainda que a ingestão crônica de L-arginina, pura ou combinada, também pode ter nenhum efeito sobre a capacidade de realizar exercício físico aeróbico em adultos saudáveis (Alvares et al, 2011). Por exemplo, Abel et al (2005) notaram que ciclistas treinados e suplementados com uma menor (2.8g L-arginina adicionado com 2.2g aspartato) ou maior concentração de L-arginina (5.7g L-arginina adicionado 8.7g aspartato) por 28 dias não tiveram nenhuma melhoria na tolerância e  $\dot{V}O_{2max}$  durante exercício físico incremental, máximo. Nenhum parâmetro metabólico (p. ex., concentração de lactato, ferritina, ou ureia) e endócrino (p. ex., concentração de hormônio do crescimento, glucagon, cortisol, ou testosterona) alterou-se pós-ingestão de L-arginina com aspartato. De modo similar, Colombani et al (1999) notaram nenhum efeito ergogênico de uma combinação de aspartato adicionado com uma dose elevada de L-arginina (15g/dia por 14 dias) no tempo final de uma maratona em corredores treinados. Esses dados confirmam as evidências indicando que mesmo elevadas doses de L-arginina (> 10 g/dia) são pouco efetivas para melhorar o fluxo sanguíneo (Adams et al, 1995) e o desempenho

físico aeróbico em humanos. Porém, torna-se relevante citar evidências recentes que sugerem um potencial efeito ergogênico da ingestão crônica de L-arginina sobre respostas respiratórias durante exercício físico. De fato, Koppo et al (2009) notaram uma resposta dinâmica do  $\dot{V}O_2$  mais veloz no começo do exercício físico moderado pós-ingestão de 6 g L-arginina. Um rápido aumento no  $\dot{V}O_2$  requer o trabalho coordenado dos sistemas cardiorrespiratório e muscular, responsáveis por regular o fluxo de oxigênio e de substratos energéticos para os músculos ativos e remover o calor, dióxido de carbono, e outros produtos derivados dos processos metabólicos. Portanto, uma resposta dinâmica (ou cinética) do  $\dot{V}O_2$  mais veloz pode significar uma menor produção de ácido láctico e íons hidrogênio nos músculos ativos, retardando o processo de fadiga muscular (Poole e Jones, 2005). Porém, Koppo et al (2009) não examinaram os possíveis efeitos das repostas de  $\dot{V}O_2$  no desempenho físico e retardo na fadiga muscular. Desse modo, com base nos estudos supracitados e outros na literatura (Camic et al, 2010, 2011; Campbell et al, 2006), pode-se sugerir que a ingestão crônica de L-arginina também apresenta efeitos triviais sobre a capacidade de realizar exercício físico aeróbico em adultos saudáveis.

De acordo com os achados desta revisão sistemática, conclui-se que a administração dietética, oral ou intravenosa, do aminoácido L-arginina, pura ou combinada, pouco afeta parâmetros de aptidão aeróbica e desempenho físico em adultos jovens. Porém, devido aos diversos vieses metodológicos encontrados nos estudos precedentes, ressalta-se a necessidade de investigações futuras sobre o papel da L-arginina sobre o desempenho físico aeróbico. Em termos práticos, profissionais da saúde que atuam na avaliação física, prescrição de exercício físico, e orientação nutricional, podem usar as informações contidas neste texto para tomada de decisão sobre o uso seguro e eficiente da L-arginina no contexto do exercício físico em humanos.

## 4.2 DEFINIÇÃO DE TÓPICOS

Após revisão inicial do papel da l-arginina em tecidos humanos e processo de seleção de artigos científicos para a revisão sistemática sobre os efeitos agudos e crônicos da suplementação de l-arginina sobre o desempenho aeróbico, definiu-se os tópicos a serem inseridos no Guia Prático. Na primeira parte do material, destacam-se informações básicas sobre o aminoácido l-arginina, conforme segue:

- (1) Nossa Proposta
- (2) O Mercado de Suplementos Alimentares
- (3) A Descoberta do Óxido Nítrico
- (4) O Aminoácido L-arginina
- (5) Suplementação de L-arginina e Desempenho Aeróbico
- (6) Considerações Finais

Na segunda parte do material, buscou-se uma breve introdução ao estudo científico realizado em nossa Instituição e apresentado como manuscrito científico neste relatório técnico, como segue:

- (1) Contexto Experimental
- (2) Delineamento do Estudo
- (3) Resultados
- (4) Considerações Finais

Por fim, na última parte do material, são apresentadas as seguintes informações:

- (1) Referências Bibliográficas
- (2) Anotações

#### 4.3 ARTE FINAL E SOLICITAÇÃO DO ISBN

Após a descrição do conteúdo, um profissional de design gráfico foi contratado para concluir os processos de criação, diagramação, e arte final do Guia Prático. Utilizou-se programas de edição de imagens CorelDraw e Photoshop (Versão 7.1), considerando as dimensões do Guia de 21.0 x 29.7 cm (A4).

Por fim, após aprovação pela comissão examinadora o Guia Prático será submetido à avaliação de mérito na editora da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), visando a solicitação do número International Standard Book Number (ISBN), com a posterior divulgação do material.



## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T, Knechtle B, Perret C, Eser P, Von Arx P, Knecht H (2005) Influence of chronic supplementation of arginine aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Int J Sports Med* 26:344-349
- Alvares TS, Conte-Junior CA, Silva JT, Paschoalin VM (2014) L-arginine does not improve biochemical and hormonal response in trained runners after a 4 weeks of supplementation. *Nutr Res* 34:31-39
- Alvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, Paschoalin VM, Gomes PS (2011) L-arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med* 41:233-248
- Anderson JE (2000) A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 11:1859-1874
- Bailey RJ, Gahche JJ, Miller PE, Thomas RP, Dwyer JT (2013) Why US adults use dietary supplements? *JAMA* 172:355-361
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al (2009) Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol* 107:1144-1155
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al (2010) Acute L-arginine supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol* 109:1394-1403
- Bednarz B, Jaxa-Chamiec T, Maciejewski P, Szpajer M, Janik K, Gniot J, et al (2005) Efficacy and safety of oral l-arginine in acute myocardial infarction: Results of the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled ARAMI pilot trial. *Kardiol Pol* 62:421-427
- Bescos R, Gonzalez-Haro C, Pujol P, Drobnic F, Alonso E, Santolaria ML, et al (2009) Effects of dietary L-arginine intake on cardiorespiratory and metabolic adaptation in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 19:355-365
- Bescos R, Sureda A, Tur JA, Pons A (2012) The effect of nitric oxide related supplements on human performance. *Sports Med* 42:99-117
- Bloomer RJ, Williams SA, Canale RE, Farney TM, Kabir MM (2010) Acute effect of nitric oxide supplement on blood nitrate/nitrite and hemodynamic variables in resistance trained men. *J Strength Cond Res* 24:2587-2592
- Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC (1998) L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 46:489-497

- Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173:17-26
- Boger RH (2008) L-arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11:55-61
- Boger RH, Bode-Boger SM (2001) The clinical pharmacology of L-arginine. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 41:79-99
- Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, et al (2003) Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4268-4272
- Buford BN, Koch AJ (2004) Glycine-arginine-alpha-ketoglutaric acid improves performance of repeated cycling sprints. *Med Sci Sports Exerc* 36:583-587
- Burtscher M, Brunner F, Faulhaber M, Hotter B, Burtscher R (2005) The prolonged intake of L-arginine-L-aspartate reduces blood lactate accumulation and oxygen consumption during submaximal exercise. *J Sports Sci Med* 4:314-322
- Camic CL, Housch TJ, Zuniga JM, Hendrix RC, Mielke M, Johnson GO, et al (2010a) Effects of arginine-based supplements on the physical working capacity at the fatigue threshold. *J Strength Cond Res* 24:1306-1312
- Camic CL, Housch TJ, Mielke M, Zuniga JM, Hendrix RC, Johnson GO, et al (2010b) The effects of 4 weeks of an arginine-based supplements on gas exchange threshold and peak oxygen uptake. *Appl Physiol Nutr Metab* 35:286-293
- Campbell B, Roberts M, Kerksick C, Wilborn C, Marcello B, Taylor L, et al (2006) Pharmacokinetics, safety, and effects on exercise performance of l-arginine-ketoglutarate in trained adult men. *Nutrition* 22:872-881
- Chen S, Kim W, Henning SM, Carpenter CL, Li Z (2010) Arginine and antioxidant supplement on performance in elderly male cyclists: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* 7:13
- Clarkson P, Adams M, Powe A, Donald AE, McCredie R, Robinson J (1996) Oral l-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 97:1989-1994

- Colombani PC, Bitzi R, Frey-Rindova P, Frey W, Arnold M, Langhans W, et al (1999) Chronic arginine aspartate supplementation in runners reduces total plasma amino acid level at rest and during a marathon run. *Eur J Nutr.* 38:263-270
- DaSilva DV, Conte-Junior CA, Paschoalin VM, Alvares TS (2014) Hormonal response to l-arginine supplementation in physically active individuals. *Food Nutr Res* (ahead of print)
- De Lorgeril M (1998) Dietary arginine and the prevention of cardiovascular research. *Cardiovasc Res* 37:560-563
- Denis C, Dormois D, Linossier MT, Eychenne JL, Hauseux P, Lacour JR (1991) Effect of L-arginine aspartate on the Exercise-induced hyperammonemia in humans: a two periods cross-over trial. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 99:123-127
- DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, et al (2000) Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 102:1351-1357
- Dietary Supplement Health & Education Act of 1994. Publ L No 103-417, 108 Stat 4325 (October 25, 1994)
- Dweik RA (2007) The lung in the balance: Arginine, methylated arginines, and nitric oxide. *Am J Physiol* 292:L15-L17
- Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL (1998) Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: Results of a follow-up national survey. *JAMA* 280:1569-1575
- Evans RW, Fernstrom JD, Thompson J, Morris Jr SM, Kuller LH (2004) Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with l-arginine. *J Nutr Biochem* 15:534-539
- Fagard RH (2002) Epidemiology of hypertension in the elderly. *Am J Geriatr Cardiol* 11:23-28
- Ferguson SK, Hirai DM, Copp SW, Holdsworth CT, Allen JD, Jones AM, et al (2013) Impact of dietary nitrate supplementation via beetroot juice on exercising muscle vascular control in rats. *J Physiol* 591:547-557

- Forbes SC, Harber V, Bell GJ (2013) The acute effects of l-arginine on hormonal and metabolic responses during submaximal exercise in trained cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 23:369-377
- Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y (1996) Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 227:88-93
- Froiland K, Koszewski W, Hingst J, Kopecky L (2004) Nutritional supplement use among college athletes and their sources of information. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 14:104-120
- Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO (2008) The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide* 19:333-337
- Grimble GK (2007) Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *J Nutr* 137:1693-1701
- Hickner RC, Tanner CJ, Evans CA (2006) L-citrulline reduces time to exhaustion and insulin response to a graded exercise test. *Med Sci Sports Exerc* 38:660-666
- Hirai DM, Copp SW, Ferguson SK, Holdsworth CT, McCullough DJ, Behnke BJ (2012) Exercise training and muscle microvascular oxygenation: functional role of nitric oxide. *J Appl Physiol* 113:557-565
- Hirai DM, Copp SW, Hageman KS, Poole DC, Musch TI (2011) Aging alters the contribution of nitric oxide to regional muscle hemodynamic control at rest and during exercise in rats. *J Appl Physiol* 111:989-998
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:879-886
- Jones AM (2014) Dietary nitrate supplementation and exercise performance. *Sports Med* 35-45
- Katan MB (2009) Nitrate in foods: harmful or healthy? *Am J Clin Nutr* 90:11-12
- King DE, Mainous AG, Geesey ME (2008) Variation in L-arginine intake follow demographic and lifestyle factors that may impact cardiovascular disease risk. *Nutr Res* 28:21-24
- Koppo K, Taes YE, Pottier A, Boone J, Bouckaert J, Derave W (2009) Dietary arginine supplementation speeds pulmonary VO<sub>2</sub> kinetics during cycle exercise. *Med Sci Sports Exerc* 41:1626-1632
- Koshland Jr DE (1992) The molecule of the year. *Science* 258:1861
- Krumbach CJ, Ellis DR, Driskell JA (1999) A report of vitamin and mineral supplement use among university athletes in a Division I institution. *Int J Sport Nutr* 9:416-425

- Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, et al. (2011) Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of walking and running: a placebo-controlled study. *J Appl Physiol* 110:591-600
- Lerman A, Burnett Jr J, Higano S, McKinley RN, Holmes DR (1998) Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 97:2123-2128
- Malinauskas BM, Overton RF, Carraway VG, Cash BC (2007) Supplements of interest for sport-related injury and sources of supplement information among college athletes. *Adv Med Sci* 52:50-54
- Massad SJ, Shier NW, Koceja DM, Ellis NT (1995) High school athletes and nutritional supplements: A study of knowledge and use. *Int J Sport Nutr* 5:232-245
- Minuskin ML, Lavine ME, Ulman EA, Fisher H (1981) Nitrogen retention, muscle creatine and orotic acid excretion in traumatized rats fed arginine and glycine enriched diets. *J Nutr* 111:1265-1274
- Moncada S, Higgs A (1993) The l-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012
- Morris Jr SM (2006) Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr* 83:5085-5125
- Morrison RJ, Miller III C, Reid MB (1996) Nitric oxide effects on shortening velocity and power production in the rat diaphragm. *J Appl Physiol* 80:1065-1069
- Muller-Delp JM, Spier SA, Ramsey MW, Delp MD (2002) Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol* 283:1662-1672
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316:175-180
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896-899
- Palmer ME, Haller C, McKinney PE, Klein-Schwartz W, Tschirgi A, Smolinske SC, et al (2003) Adverse events associated with dietary supplements: An observational study. *Lancet* 36:101-106
- Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K (1996) Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral l-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 93:2135-2141
- Rogers MA, Vaughan TL, Davis S, Thomas DB (1995) Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:29-36

- Schaefer A, Piquard F, Geny B, Doutreleau S, Lampert E, Mettauer B, et al (2002) L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. *Int J Sports Med* 23:403-407
- Schullman SP, Becker LC, Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S (2006) L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* 295:58-64
- Sellman J, DeRuisseau K, Betters J, Lira VA, Soltow QA, Selsby JT, et al (2006) In vivo inhibition of nitric oxide synthase impairs upregulation of contractile protein mRNA in overloaded plantaris muscle. *J Appl Physiol* 100:258-265
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81:209-237
- Sunderland KL, Greer F, Morales J (2011) VO<sub>2</sub>max and ventilatory threshold of trained cyclists are not affected by 28-day L-arginine supplementation. *J Strength Cond Res* 25:833-837
- Sureda A, Cordova A, Ferrer MD, Tauler P, Perez G, Tur JA, et al (2009) Effects of L-citrulline oral supplementation on polymorphonuclear neutrophils oxidative burst and nitric oxide production after exercise. *Free Radic Res* 6:1-8
- Taddei S, Galetta F, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Franzoni F, et al (2000) Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation* 101:2896-2901
- Tekin KA, Kravitz L (2004) The growing trend of ergogenic drugs and supplements. *ACSM Health Fitness J* 8:15-18
- Tiwary CM, Rosenbloom AL, Julius RL (1973) Anaphylactic reaction to arginine infusion. *N Engl J Med* 288:218
- Vallance P, Chan N (2001) Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85:342-350
- Vanhatalo A, Bailey SJ, DiMenna FJ, Blackwell JR, Wallis GA, Jones AM (2013) No effect of acute L-arginine supplementation on O<sub>2</sub> cost or exercise tolerance. *Eur J Appl Physiol* 113:1805-1819
- Waugh WH, Daeschner III CW, Files BA, McConnell ME, Strandjord SE (2001) Oral citrulline as arginine precursor may be beneficial in sickle cell disease: early phase two results. *J Natl Med Assoc* 93:363-371
- Wu G, Morris Jr SM (2004) Arginine metabolism in mammals. Cynober LA, eds. *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*. CRC Press: Boca Raton

## **6 APÊNDICE A**

### **Guia Prático**

## **7 APÊNDICE B**

### **Manuscrito Científico**



**ADJUSTMENTS OF PULMONARY O<sub>2</sub> UPTAKE AND MUSCLE DEOXYGENATION  
DURING INCREMENTAL RAMP EXERCISE IN YOUNG ADULTS: INFLUENCE OF  
ACUTE L-ARGININE SUPPLEMENTATION**

## Introduction

The study of the physiological response of humans to a ramp or incremental step exercise test to exhaustion has revealed much about both the mechanisms governing the cardiovascular adjustments with exercise and of factors of intracellular loci of metabolic regulation of oxidative phosphorylation. Although comprehensive reviews have discussed the factors controlling the dynamic adjustment of oxygen delivery and oxygen utilization during ramp or incremental step exercise test (Boone and Bourgois, 2012; Murias et al, 2014), debate still remains about the mechanisms governing the control of both muscle microvascular blood flow ( $Q_m$ ) and muscle oxygen utilization ( $VO_{2m}$ ) across exercise intensities. This can predominantly be attributed to methodological constraints since measurements of  $Q_m$  and/or  $VO_{2m}$  in humans are invasive and/or are typically made in larger conduit vessels in the exercising limbs, which may not reflect the dynamic changes in the capillaries, where gas exchange occurs (Harper et al, 2006). Lately near-infrared spectroscopy (NIRS) has been introduced as a useful alternative that allows non-invasive registration of muscle oxygenation and hemodynamics at the level of the microcirculation. On the basis of the different absorption spectra of the near-infrared light at different wavelengths, NIRS can differentiate between the two major forms of hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb), i.e., oxy [Hb + Mb] and deoxy [Hb + Mb] (Van Beekvelt et, 2001). Deoxy [Hb + Mb] can be considered a proxy for microvascular oxygen extraction and arteriovenous oxygen difference ( $C(a-v)O_2$ ) (DeLorey et al, 2003), and according to the Fick equation [ $C(a-v)O_2 = VO_{2m}/Q_m$ ], it can be assumed that the pattern of deoxy [Hb + Mb] during exercise can provide insight into the relationship between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$ , especially because deoxy [Hb + Mb] seems to be less affected by changes in blood volume under the NIRS probe during exercise compared with oxy [Hb + Mb] (Grassi et al, 2003; Ferreira et al, 2006). Therefore, NIRS can provide unique, noninvasive insight into the factors controlling the relationship between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$  during dynamic exercise that is a major determinant of the exercise capacity in both healthy subjects and patients (Boone et al, 2012).

Previous studies have demonstrated the occurrence of a linear steady state relationship between systemic blood flow [cardiac output (Q)] and whole body oxygen uptake ( $VO_2$ ) during constant load exercise performed across a wide range of exercise intensities. As a consequence, when plotted as a function of work rate, the profile of fractional oxygen extraction or  $C(a-v)O_2$  across the same range of exercise displays a hyperbolic pattern, since  $VO_2 = Q \times C(a-v)O_2$  (Rowell, 1974; Proctor et al, 1998; Barker et al, 1999). If deoxy [Hb + Mb] is proportional to fractional oxygen extraction or  $C(a-v)O_2$ , a similar hyperbolic pattern would be expected for deoxy [Hb + Mb] as a function of work rate (DeLorey et al, 2003; Ferreira et al, 2005). Several studies, however, demonstrated that a sigmoid rather than a hyperbolic model provides a better fit to the deoxy [Hb + Mb] response to steady state, incremental step exercise test (Grassi et al, 2003; Boone et al, 2010) or non-steady state, ramp exercise test (Ferreira et al, 2007; Boone et al, 2009, 2010, 2012). This sigmoid pattern indicates a dynamic nonlinear relationship between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$ , that is, a faster increase in  $Q_m$  compared with  $VO_{2m}$  at the onset of the ramp followed by a progressive slower increase in  $Q_m$  relative to  $VO_{2m}$  at the end of exhaustive exercise. This sigmoidal increase in deoxy [Hb + Mb] response as a function of work rate could be, at least in part, explained by central and/or local factors such as (1) the mechanical effects of muscle contraction (i.e., muscle pump and rapid vasodilation) in the early phase of a ramp exercise test; (2) the Bohr effect and the appearance of a lactic acidosis as work rate increases; (3) changes in sympathetic–parasympathetic balance in cardiovascular control; and (4) muscle fibre characteristics and changes in recruitment as work rate increases (Rowell, 1974; Behnke et al, 2003; Ferreira et al, 2007). From a practical perspective, this sigmoid pattern of the deoxy [Hb + Mb] response could be used as a suitable tool to assess changes in the nonlinear relationship between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$  and to detect early stages of microvascular dysfunction during clinical exercise testing.

As previously mentioned, the information obtained from deoxy [Hb + Mb] response provides insights into the relationship between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$ . For instance, a rightward shift of the

pattern of deoxy [Hb + Mb] during ramp exercise test may be reflective of better perfusion and balance between  $Q_m$  and  $VO_{2m}$ ; however, this may also indicate a reduced need for  $Q_m$  and  $VO_{2m}$  that occurs with lower muscle activation (Ferreira et al, 2007; Chin et al, 2011). Chronic exercise training (Shoemaker et al, 1996; Ferreira et al, 2007; Boone et al, 2009) and/or pharmacological treatment (Drexler et al, 1995) are examples of interventions that are associated with a rightward shift in the pattern of deoxy [Hb + Mb] during dynamic exercise; however, it seems logical to speculate that other approaches could have a similar impact on the dynamic adjustment of oxygen delivery and oxygen utilization as well as on the pattern of deoxy [Hb + Mb] during ramp or incremental step exercise. For instance, the signaling molecule nitric oxide (NO), produced by the NO synthase (NOS) family of enzymes responsible for catalyze the oxidation of L-arginine (Moncada et al, 1988; Moncada and Higgs, 2006), has been reported to contribute to vasodilation that increases  $Q_m$  and enhances oxygen delivery to the active musculature in humans (Cooper and Giulivi, 2007). Dietary supplementation with L-arginine, the substrate for NOS, is thought to increase NO bioavailability in humans (Maxwell et al, 2001; Bailey et al, 2010), and would elicit similar responses. Most studies (Stevens et al, 2000; Buford and Koch, 2004; Koppo et al, 2009; Bailey et al, 2010), but not all (Béscos et al, 2009; Liu et al 2009; Vanhatalo et al 2013) have shown reduced systemic blood pressure and improved exercise efficiency and exercise tolerance following dietary L-arginine supplementation in healthy subjects and patients. While the mechanisms responsible for the latter effects are poorly understood, they likely involve an increased  $Q_m$  and direct effects of NO on muscle contractile efficiency or mitochondrial function (Stamler and Meissner, 2001; Alvares et al, 2012). Therefore, dietary supplementation with L-arginine could be a valid approach to further elucidate the mechanisms governing the regulation of both muscle  $Q_m$  and  $VO_{2m}$  across exercise intensities.

Therefore, the purpose of this study was to gain better insight into the underlying mechanisms of the sigmoid pattern of deoxy [Hb + Mb] response to incremental ramp exercise by means of

an acute oral L-arginine supplementation. Using changes in NIRS-derived deoxy [Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary VO<sub>2</sub> measurements, we hypothesized that the pattern of deoxy [Hb + Mb] will follow a sigmoid profile in response to the non-steady state ramp exercise test and that this profile will be rightward shifted in response to the acute dietary supplementation with L-arginine. From a practical standpoint, the results from this study will reinforce that the sigmoid profile of the deoxy [Hb + Mb] response to incremental ramp exercise test could be used as a suitable tool to assess changes in the nonlinear relationship between Q<sub>m</sub> and VO<sub>2m</sub> and to detect effective dietary interventions for adjusting the oxygen delivery and oxygen utilization within exercising muscles in humans.

## **Methods**

### **Subjects**

Eleven male adults between 18 and 40 yr of age were recruited to participate in this study. A detailed written explanation of the experimental protocol was given to all subjects before they were tested. None of them should smoke tobacco and use dietary supplementation or take any medication that could affect their cardiorespiratory or metabolic responses to exercise. In the 24 h preceding the first exercise test, they recorded their food intake, and this diet was replicated in the 24 h preceding subsequent tests (please see Nutrient Intake section). Additionally, they were instructed to arrive at the laboratory in a rested and fully hydrated state,  $\geq 3$  h postprandial, and to refrain from caffeine and alcohol intake 6 and 24 h before each test, respectively. Subjects were asked to avoid strenuous exercise in the 24 h preceding each testing session. Finally, they were required to be in good health and none of them could have medical contraindications for participation in the study. All subjects had previously been involved in cycle ergometer studies at this intensity in similar conditions, and were fully familiar with the study procedures.

## Experimental Overview

All subjects were required to report to the laboratory on two separate occasions over a period of 2 wk. Upon arrival to the laboratory, subjects rested for 10 min in a seated position. After the rest period, the blood pressure was measured. Subjects were then randomly assigned to ingest 6 g of L-arginine or placebo (see Supplementation protocol section) 90 min prior to exercise. This approach is based on the findings of Bode-Boger et al (1998) who reported that 6 g of oral L-arginine significantly elevated plasma [L-arginine] with the peak values being maintained between 60 to 150 min post-ingestion. This approach is also similar to those of Vanhatalo et al (2013), where 6 g of L-arginine were administered as a part of a pure supplement 90 min before exercise. After the 90 min rest period, a replicated blood pressure measurement was taken. Subjects then performed a ramp incremental exercise tests to the limit of tolerance on an electromagnetically braked cycle ergometer. In each ramp exercise protocol, the work rate increased linearly and continuously with a rate of 35 W min<sup>-1</sup> (~0.58 W min<sup>-1</sup>). Previous studies (Boone et al, 2009; 2010) have shown that this ramp slope would lead to exhaustion in ~12 min in a group of trained subjects. The actual ramp increase in work rate was preceded by 3 min of rest on the cycle ergometer and by 3 min of baseline cycling at 40 W. The baseline value of 40 W was used to ensure that possible changes in mechanical efficiency at very low work rates would not interfere with the linear increase in VO<sub>2</sub> (Boone et al, 2008). The test was terminated when the subject could no longer maintain the instructed pedal rate (60 - 75 rpm). The instantaneous pedal rate was continuously visualized on a display connected to the cycle ergometer, so that the subject were fully informed about the cadence throughout the exercise tests. All subjects were asked to arrive in the laboratory in the morning (between 06:00 and 10:00 a.m.) and all exercise tests were performed at the same time ( $\pm$  2 h) of the day to avoid circadian variance.

## Supplement Protocol

Subjects were randomly assigned to receive either 6 g of L-arginine (Sigma, St Louis, MO; administered with 0.5 L of water) or placebo (starch) gelatinous capsules in a double-blind crossover design, with a 7 d washout period between the two conditions. A 7 d washout period is enough because the elimination half-life of a single oral dose of 6 g of L-arginine is ~ 80 min (Bode-Boger et al, 1998). Placebo capsules were at the same size, color, and flavor as the L-arginine capsules. Compliance with the acute dietary supplement with L-arginine was 100%.

## Gas exchange and heart rate measurements

During all exercise tests, pulmonary gas exchange and ventilation were measured continuously on a breath-by-breath basis by means of a portable gas analysis system (K4b2, Cosmed srl, Rome, Italy). A turbine digital transducer measured inspired and expired airflow; otherwise, an electrochemical cell O<sub>2</sub> analyser and infrared CO<sub>2</sub> analyser simultaneously measured expired gases using a capillary line connected to a mouthpiece. The analyser was calibrated before each test with gases of known concentration, and turbine volume transducer was calibrated using a 3 L syringe (Hans Rudolph, Kansas City, MO). The analyser was previously validated for measuring gas exchanges over a wide range of exercise intensities (McLaughlin et al, 2001). Heart rate was recorded by means of the K4b2 system from a chest belt transmission (Polar Electro, Kempele, Finland).

## Nutrient Intake

Subjects will be instructed to record their food intake for 24 h before the first exercise test and were asked to replicate the same diet before subsequent tests. Under the supervision of nutritionists, they were advised to follow a diet rich in carbohydrate (> 4 g.kg<sup>-1</sup>) body weight,

which, in combination with light training or rest, would allow subjects to start the tests with adequate glycogen stores (Pfeiffer et al, 2010). Diet was assessed with 24 h recalls the days before the tests, and carbohydrate intake of all subjects were confirmed to be (or not to be)  $> 4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight. The participants were also instructed to report in the dietary records any adverse events from the dietary supplementation with L-arginine or placebo on their health status.

#### Near Infrared spectroscopy

Local deoxy [Hb + Mb] profiles of the quadriceps vastus lateralis muscle was measured by means of a commercially available data acquisition and analysis NIRS system (Portamon, Artinis Medical Systems BV, The Netherlands). A detailed explanation of the principles of operation and algorithms utilized by the system is described elsewhere (Elwell, 1995; Van Beekvelt, 1995). Briefly, the system consists of a small portable unit that contains a light source, which emits near-infrared wavelengths of 750 and 850 nm and a detection probe (30mm away) to measure the returning signals. The intensity of incidence and transmitted light is transmitted in real time via Bluetooth to a laptop computer and recorded continuously at 10 Hz and used to assess concentration changes from the resting baseline for deoxy [Hb + Mb] and oxy [Hb + Mb] hemoglobin and myoglobin. Although the contribution of deoxygenated myoglobin to the NIRS signal is unclear, the terms deoxy [Hb + Mb] and oxy [Hb + Mb] referred to the combined concentrations of hemoglobin and myoglobin (Kenjale et al, 2011). The NIRS data represent a relative change based on the optical density from the resting baseline measure for deoxy [Hb + Mb] and oxy [Hb + Mb]. Since deoxy [Hb + Mb] is essentially blood volume insensitive during exercise (Grassi et al, 2003; Ferreira et al, 2006), the parameter was assumed to provide an estimate of changes in the fractional O<sub>2</sub> extraction in the area of interrogation (DeLorey et al, 2003).



The Portamon unit was positioned longitudinally on the distal section of vastus lateralis muscle of the left leg and secured in place using an elastic wrap/stocking around the thigh, which was tight enough to avoid probe movement but not to restrict leg blood flow or venous return. The NIRS unit and the skin was covered with a black, light-absorbing cloth to minimize the possibility that extraneous light could influence the signal. Prior to the placement of the NIRS unit, however, the system was calibrated and the skin was shaved. Pen surgical marks were made on the skin to indicate the margins of the unit to check for any downward sliding during the exercise and for accurate repositioning of the unit on the subsequent visits to the laboratory. Skinfold thickness at the site of application of the NIRS unit was determined before the testing trials using Harpenden skinfold caliper. NIRS data were recorded throughout the ramp exercise test. The resulting NIRS data then was reduced to a 1 Hz Excel data file and stored for later analysis.

#### Data Analysis

Breath-by-breath pulmonary gas exchange data were filtered by removing aberrant data that lay outside 4 standard deviation (SD) of the local mean, as they did not conform to a Gaussian distribution as previously described by Lamarra et al (1987). The gas exchange profile then was further time averaged into 5 s bins to provide a single time averaged response for each subject in both placebo and l-arginine conditions. The second-by-second  $\Delta\text{deoxy [Hb + Mb]}$  was time aligned and ensemble averaged in the same manner. The ensemble averaged  $\Delta\text{deoxy [Hb + Mb]}$  were then normalized ( $\%\Delta\text{deoxy [Hb + Mb]}$ ) to the total amplitude of the response in the placebo and l-arginine conditions, such that 0% represents the average value of the final 60 s of the 3 min cycling period at 40 W and 100% represents the average value of the final 15 s of the exercise test (i.e.,  $\Delta\text{deoxy [Hb + Mb]}_{\text{peak}}$ ). The  $\%\Delta\text{deoxy [Hb + Mb]}$  was time aligned with  $\text{VO}_2$  by left-shifting the  $\text{VO}_2$  profile data back by 20 s to account for the circulatory transit delay between muscle and lung; this was undertaken so that changes in ' $\text{VO}_2\text{m}$ ' (represented by

VO<sub>2</sub>) will align with changes in the %Δdeoxy [Hb + Mb] signal (Boone et al, 2010; Murias et al, 2014). If this 20 s value may not precisely match the circulatory time lag in all subjects is unknown; however, this 20 s value has been proposed as a reasonable estimate for the circulatory time delay occurred in the onset of exercise (Murias et al, 2013; Spencer et al, 2012).

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

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

where f<sub>0</sub> represents the baseline, A is the amplitude, d is the slope of the sigmoid, and c/d is the x value corresponding to 50% of A.

The peak oxygen uptake (VO<sub>2peak</sub>) was defined as the highest 10 s mean value attained before the subject's volitional exhaustion in the test (Bailey et al, 2010). The gas exchange threshold (GET) was defined as the point at which CO<sub>2</sub> production (VCO<sub>2</sub>) began to increase out of proportion in relation to VO<sub>2</sub> with a systematic rise in minute ventilation (VE)-to-VO<sub>2</sub> ratio and end tidal PO<sub>2</sub>, whereas VE-to-VCO<sub>2</sub> ratio and end tidal PCO<sub>2</sub> was stable (Beaver et al., 1981). Both VO<sub>2peak</sub> and GET was described as a function of body mass. Maximal power output (W<sub>max</sub>) was determined by the following formula:  $W_{max} = W_{out} + [(t/60)^{35}]$ , where W<sub>out</sub> is the power output (W) during the last completed stage and t is the time (s) in the final stage (Pfeiffer et al, 2010). The slope of the time averaged VO<sub>2</sub> to work rate profiles for ramp exercise test [reflecting the functional VO<sub>2</sub> gain (ΔVO<sub>2</sub>/ΔWR)] was determined using linear regression analysis ( $y = ax + b$ ) (Boone et al, 2012).

## Statistical Analysis

The mean values  $\pm$  SD were determined for time of exhaustion, VO<sub>2</sub>peak, GET, Wmax, and functional VO<sub>2</sub> gain in both supplementation conditions and these parameters were compared using a paired t test. The sigmoid model for the pattern of deoxy [Hb + Mb] were calculated by means of fit curve in Sigmaplot 10.0. From the output file, the R<sup>2</sup> values, the residual sum of squares, and the F-value was calculated to determine the best fitting model for each individual test. The mean values  $\pm$  SD for the parameters in the best fitting model were determined and compared between the supplementation conditions using a paired-samples t test. Significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

The ramp protocol lasted on average  $490 \pm 22$  sec in L-arginine supplementation condition, whereas the ramp protocol lasted  $492 \pm 15$  sec in placebo condition. As unexpected, participants reached a significantly higher Wmax in the L-arginine supplementation condition ( $343W \pm 27$ ) compared with placebo condition ( $347W \pm 32$ ). Peak VO<sub>2</sub> did not differ significantly between the two conditions ( $54.3 \pm 2.9$  and  $53.1 \pm 3.5$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> for the L-arginine supplementation and placebo conditions, respectively). The GET, determined during the ramp exercise, occurred on average at  $54.3 \pm 2.9\%$  and  $53.1 \pm 3.5\%$  for the L-arginine supplementation and placebo conditions, respectively.

In Figure 1, the deoxy [HB + Mb] response for the ramp protocol in the distal section of the musculus vastus lateralis is presented for a representative subject. In Table 1, the means values  $\pm$  SD for the parameters of the sigmoid model of both supplementation conditions are presented. The baseline ( $f_0$ ), amplitude (A) and the slopes of the sigmoid (d) did not differ significantly between the two supplementation conditions. The c/d point of the sigmoid, that is, the work rate

corresponding to  $(f_0 + A)/2$  was also similar between the two supplementation conditions, when described as a function of relative (%peakP) work rate for both supplementation conditions.

Table 1. Mean  $\pm$  SD values for the baseline ( $f_0$ ), amplitude (A), slope (d), and the work rate corresponding to 50% of the amplitude (c/d point) of the sigmoid model fitted to the deoxy [Hb + Mb] response for both l-arginine supplementation and placebo conditions as functions of absolute (W) and relative work rate (%peak).

	L-Arginine Supplementation			Placebo Supplementation		
$f_0$ (%)	-6.0	$\pm$	3.4	-5.8	$\pm$	3.4
A (%)	106.3	$\pm$	6.2	103.5	$\pm$	11.1
d (% peakP <sup>-1</sup> )	6.6	$\pm$	4.3	6.7	$\pm$	4.0
c/d (%peakP)	53.9	$\pm$	5.9	54.5	$\pm$	4.7

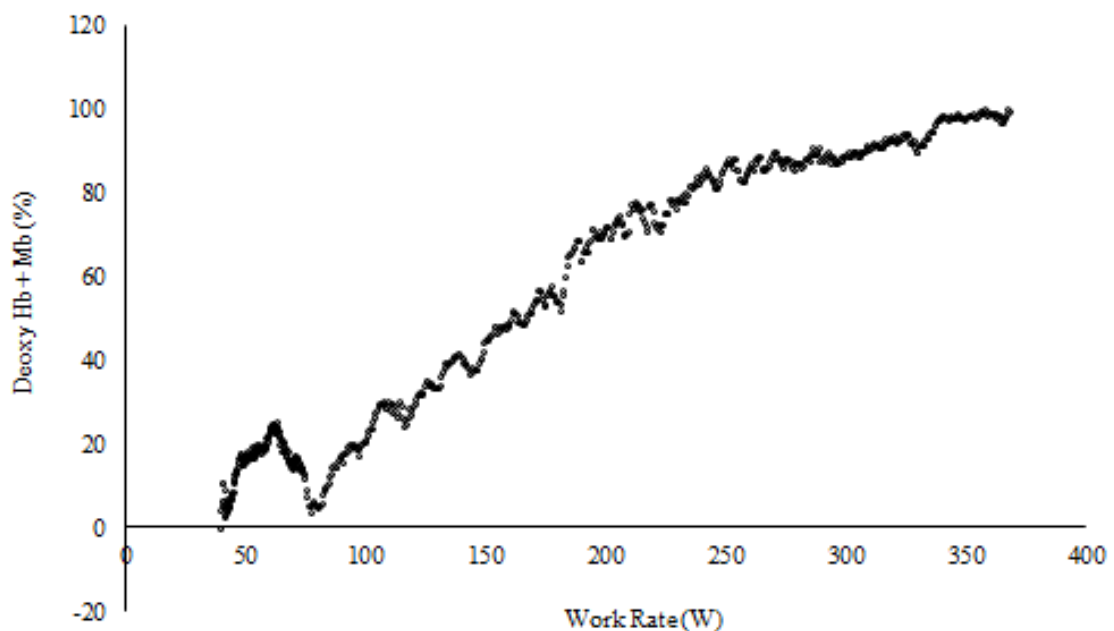


Figure 1. Deoxy [Hb + Mb] response as a function of absolute work rate for a representative subject.

## Discussion

The purpose of this study was to gain better insight into the underlying mechanisms of the sigmoid pattern of deoxy [Hb + Mb] response to incremental ramp exercise by means of an acute oral L-arginine supplementation. Using changes in NIRS-derived deoxy [Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary VO<sub>2</sub> measurements, we hypothesized that the pattern of deoxy [Hb + Mb] will follow a sigmoid profile in response to the non-steady state ramp exercise test and that this profile will be rightward shifted in response to the acute dietary supplementation with L-arginine. As expected, the pattern of deoxy [Hb + Mb] followed a sigmoid profile in response to the non-steady state, ramp exercise test; however, it should be noted that the sigmoid profile was not shifted in response to the acute dietary supplementation with L-arginine. This finding indicates that L-arginine administration was not able to affect both NIRS-derived deoxy [Hb + Mb] and breath-by-breath pulmonary VO<sub>2</sub> measurements during a ramp exercise test.

The findings of this research are in agreement with previous studies (Béscos et al, 2009; Alvares 2012; Vanhatalo et al, 2013) and reinforce that oral, but not intravenous, supplementation with L-arginine might not be able to cause a better regulation of the relationship between Q<sub>m</sub> and VO<sub>2m</sub> during dynamic exercise in healthy subjects. The results for these findings are unclear; however, it could be speculated that a small dose of L-arginine (6 g) might not be enough to proportionate any change in cardiovascular and/or metabolic responses during aerobic exercise in healthy adults. A plausible reason is related to the degradation of L-arginine in the digestive tract. L-arginine, when assimilated over the digestive tract, enters the hepatic circulation where much of the L-arginine is degraded in the liver (Hartman et al, 1994). However, this hypothesis is more exploratory in nature.

Previous studies have demonstrated the occurrence of a linear steady state relationship between Q<sub>m</sub> and VO<sub>2</sub> to constant load exercise performed across a wide range of exercise intensities

(DeLorey et al, 2003; Ferreira et al, 2005; Boone et al, 2008, 2009, 2010). As a consequence, when plotted as a function of work rate, the profile of fractional oxygen extraction or  $C(a-v)O_2$  across the same range of exercise displays a hyperbolic pattern, since  $VO_2 = Q \times C(a-v)O_2$  (Rowell, 1974; Proctor et al, 1998; Barker et al, 1999). If deoxy [Hb + Mb] is proportional to fractional oxygen extraction or  $C(a-v)O_2$ , a similar hyperbolic pattern would be expected for deoxy [Hb + Mb] as a function of work rate (DeLorey et al, 2003). Most studies, however, demonstrated that a sigmoid rather than a hyperbolic model provides a better fit to the deoxy [Hb + Mb] response to steady state, incremental step exercise test (Grassi et al, 2003; Boone et al, 2010) or non-steady state, ramp exercise test (Ferreira et al, 2007; Boone et al, 2009, 2010, 2012). The rapid increase followed by a slowing effect of  $Q_m$  could be related to muscle fiber recruitment. In this context, different profiles of  $C(a-v)O_2$  as a function of  $Q_m$  between slow twitch and fast twitch muscles have been reported in rats (Ferreira et al, 2006). However, in the present investigation, no EMG measurements were carried out. Further studies are encouraged to examine the relationship between type fiber recruitment, changes in sigmoid pattern of deoxy [Hb + Mb] curves, and nutritional interventions, such as l-arginine.

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

## References

Alvares TS, Conte Jr CA, Paschoalin VMF, Silva JT, Meirelles CM, Bhambhani YN, et al (2012) Acute L-arginine supplementation increases blood volume but not strength performance. *Appl Physiol Nutr Metab* 37:115-126

Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al (2010) Acute L-arginine supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol* 109:1394–1403

Barker RC, Hopkins SR, Kellogg N, Olfert IM, Brutsaert TD, Gavin TP, et al (1999) Measurement of cardiac output during exercise by open-circuit acetylene uptake. *J Appl Physiol* 87:1506-1512

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

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

Bescos R, Gonzalez-Haro C, Pujol P, Drobnic F, Alonso E, Santolaria ML, et al (2009) Effects of dietary L-arginine intake on cardiorespiratory and metabolic adaptation in athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 19:355–365

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

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

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

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

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

Boone J, Koppo K, Bouckaert J (2008) The VO<sub>2</sub> response to submaximal ramp cycle exercise: Influence of ramp slope and training status. *Respir Physiol Neurobiol* 161:291-297

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

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

Cooper CE, Giulivi C (2007) Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption: II. Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol* 292:1993-2003



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

DeLorey DS, Kowalchuk JM, Paterson DH (2003) Relationship between pulmonary O<sub>2</sub> uptake kinetics and muscle deoxygenation during moderate-intensity exercise. *J Appl Physiol* 95:113-120

Ferreira LF, Townsend DK, Lutjemeier BJ, Barstow TJ (2005) Muscle capillary blood flow kinetics estimated from pulmonary O<sub>2</sub> uptake and near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol* 98:1820-1828

Ferreira LF, McDonough P, Behnke BJ, Musch TI, Poole DC (2006) Blood flow and O<sub>2</sub> extraction as a function of O<sub>2</sub> uptake in muscle composed of different fibre types. *Resp Physiol Neurobiol* 153:237-249

Ferreira LF, Koga S, Barstow TJ (2007) Dynamics of noninvasively estimated microvascular O<sub>2</sub> extraction during ramp exercise. *J Appl Physiol* 103:1999-2004

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

Gonzales JAN, Benayas CG, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679-681

Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO (2008) The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide* 19:333-337

Guevara I, Iwaneiko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Chim Acta* 274:177-188

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

Hartman WJ, Torre PM, Prior RL (1994) Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline. *J Nutr* 124:1950-1960.

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

Liu TH, Wu CL, Chiang CW, Lo YW, Tseng HF, Chang CK (2009) No effect of short-term arginine supplementation on nitric oxide production, metabolism and performance in intermittent exercise in athletes. *J Nutr Biochem* 20:462-46

Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, Robbins JL, Johnson JL, VanBruggen M, et al (2011) Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol* 110:1582-1591

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

Maxwell AJ, Ho HV, Le CQ, Lin PS, Bernstein D, Cooke JP (2001) L-Arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. *J Appl Physiol* 90:933–938

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

Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147:193–201

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12:365–372

Murias JM, Spencer MD, Keir DA, Paterson DH (2013) Systemic and vastus lateralis muscle blood flow and  $O_2$  extraction during ramp incremental cycle exercise. *Am J Physiol* 304:720-725

Murias JM, Spencer MD, Paterson DH (2014) The critical role of  $O_2$  provision in the dynamic adjustment of oxidative phosphorylation. *Exerc Sport Sci Rev* 42:4-11

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

Proctor DN, Beck KC, Shen PH, Eickhoff TJ, Halliwill JR, Joyner MJ (1998) Influence of age and gender on cardiac output – VO<sub>2</sub> relationships during submaximal cycle ergometry. *J Appl Physiol* 84:599-605

Radegran G (1997) Ultrasound Doppler estimates of femoral artery blood flow during dynamic knee extensor exercise in humans. *J Appl Physiol* 83: 1383–1388

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

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

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

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

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

Tang JE, Lysecki PJ, Manolagos JJ, MacDonald MJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM (2011) Bolus Arginine Supplementation affects neither muscle blood flow nor muscle protein synthesis in young men at rest and exercise. *J Nutr* 141:195-200

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

Vanhatalo A, Bailey SJ, DiMenna FJ, Blackwell JR, Wallis GA, Jones AM (2013) No effect of acute L-arginine supplementation on O<sub>2</sub> cost or exercise tolerance. *Eur J Appl Physiol* 113:1805-1819

Van Bezooijen RL, Que I, Ederveen AG, Kloosterboer HJ, Papapoulos SE, Lowik CW (1998) Plasma nitrate and nitrite levels are regulated by ovarian steroids but do not correlate with trabecular bone mineral density in rats. *J Endocrinol* 159:27-34

# CERTIFICADO

n. 143

Certificamos que

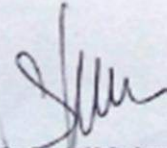
**JAYME RODRIGUES DIAS JÚNIOR, COSME FRANKLIM  
BUZZACHERA**

Participaram do Evento de Extensão:

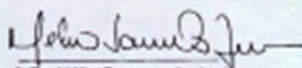
**I ENCONTRO NACIONAL DE ESPORTE &  
FITNESS: Avanços Técnicos e Científicos**

promovido pelo Departamento de Ciências do Esporte do Centro de Educação Física e Esporte da Universidade Estadual de Londrina, com apoio da Sport Training, realizado nos dias 08 e 09 de novembro de 2014, na qualidade de Apresentadores de Poster com o Tema: "SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM L-ARGININA E DESEMPENHO FÍSICO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA".

Londrina, 09 de novembro de 2014.



Prof. Dr. Sergio Meilo Arruda  
Pró-Reitor de Extensão

Prof. Dr. Hélio Serassueto Junior  
Diretor do Centro de Educação Física  
e Esporte

**Resumo Expandido Apresentado no I Encontro Nacional de Esporte & Fitness, realizado na Universidade Estadual de Londrina, no dia 09 de Novembro de 2014**

**Suplementação Nutricional com L-Arginina e Desempenho Físico: Uma Revisão Sistemática.**

Jayme Rodrigues Dias Júnior <sup>1</sup>

Cosme Franklim Buzzachera <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mestrado Profissional em Exercício Físico na Promoção da Saúde, UNOPAR

**Resumo**

A presente revisão sistemática buscou examinar os efeitos da suplementação dietética aguda e crônica com L-arginina na produção de óxido nítrico, respostas hemodinâmicas, respiratórias e neuromusculares, e sua associação com medidas de desempenho físico em humanos. Usando as principais bases de dados nas ciências da saúde (Medline, Lilacs, Scielo, e Google Scholar), com a inserção das palavras chave ‘l-arginina’, ‘óxido nítrico’, ‘desempenho físico’, selecionou-se para o estudo 14 manuscritos científicos publicados no período entre 2000 e 2014. Embora diversos estudos tenham demonstrado que a produção de óxido nítrico pode ser estimulada *in vivo* pela suplementação dietética aguda ou crônica com L-arginina, pouco ainda é conhecido sobre sua associação com efeitos hemodinâmicos, respiratórios, e neuromusculares durante exercício físico em humanos. Achados controversos ainda persistem sobre a relação existente entre ingestão aguda e/ou crônica de L-arginina, pura ou diluída com outros componentes, e indicadores de desempenho físico em humanos. Tais contradições poderiam ser oriundas de diferenças nas características da substância, dosagens e tipo de administração, além das características da amostra usada no estudo. Em resumo, o presente estudo demonstrou que embora a suplementação dietética com L-arginina possa promover efeitos na biodisponibilidade do óxido nítrico, pouco ainda é confirmado sobre seus efeitos no desempenho físico de adultos saudáveis ou portadores de condições clínicas crônicas. Portanto, a recomendação de L-arginina não é sugerida para fins terapêuticos ou para a melhoria do desempenho físico em humanos enquanto estudos futuros com delineamentos experimentais de maior robustez e duração sejam realizados.

## **Introdução**

A molécula gasosa óxido nítrico (NO) tem um papel importante na regulação da homeostase vascular gerando efeitos protetores como a inibição da agregação plaquetária (Bode-Boger et al, 1998). A L-arginina, aminoácido semiessencial precursor do NO, atua em conjunto com a enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual possui três isoformas em vários tecidos corporais: nNOS neuronal, com atuação primordial no sistema nervoso central; eNOS endotelial, atuando no endotélio vascular e com a promoção de efeitos vasodilatadores protetores; e iNOS óxido nítrico sintase indutiva, atuando sobre a função imunitária (Ignarro, 1999; Moncada & Higgs, 2006).

Durante a vasodilatação endotelial, a enzima eNOS catalisa a L-arginina com a participação reduzida do fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) atuando como doador de elétrons. Logo, NO e L-citrulina são formados, onde o NO produzido no tecido endotelial ativa a enzima guanilato ciclase no músculo liso, reduzindo guanosina trifosfato cíclica para guanosina monofosfato cíclica, a qual por sua vez atenua a liberação de cálcio intramuscular (Brunning, 1999). A inibição do cálcio impede a ativação da enzima miosina quinase no processo de contração muscular, induzindo ao relaxamento muscular liso associado com a vasodilatação (Boger, 2007).

A conversão da L-arginina para L-citrulina e NO pela ação das enzimas NOS poderia afetar numerosas funções associadas com uma melhorada capacidade de realizar exercício físico, tais como vasodilatação, hiperemia micro e macrovascular e biogênese mitocondrial (Stamler e Meissner 2001). De modo interessante, os achados de estudos relacionando administração exógena de L-arginina e exercício físico são contraditórios e pouco promissores em adultos saudáveis (Alvares et al, 2011). Nessa perspectiva, levando em consideração os possíveis mecanismos de ação da L-arginina, o presente estudo buscou revisar os efeitos da suplementação dietética da L-arginina sobre a produção de NO e capacidade de realizar exercício físico no âmbito da saúde e desempenho físico.

## **Metodologia**

Usando as principais bases de dados nas ciências da saúde *U.S. National Library of Medicine (PubMed)*, *Scientific Eletronic Library Online (SciELO)*, e *Ebsco*.) e inserindo como palavras chave os descritores verbais 'L-arginina', 'óxido nítrico', 'exercício físico' e 'desempenho físico'. Inicialmente, encontrou-se 244 manuscritos que atendiam o critério de descritores verbais, porém somente 10 trabalhos foram usados no artigo após exclusão de estudos com animais e uso intravenoso de L-arginina. A aumentada biodisponibilidade da L-arginina causada por sua infusão intravenosa pode ter contribuído para tais achados controversos, uma vez que a biodisponibilidade



da L-arginina via ingestão oral é de cerca de somente 60% devido a ação de enzimas arginases no tecido hepático (Bode-Boger et al, 1998). O período de consulta compreendeu os anos 2000 e 2014.

## Resultados

Após busca inicial, 244 artigos contendo os descritores verbais desejados foram encontrados; porém, a maioria não abordou o escopo principal do estudo visando examinar os efeitos da suplementação dietética da L-arginina sobre a produção de NO e capacidade de realizar exercício físico, seja no âmbito da saúde ou do desempenho físico.

## Discussão

A conversão da L-arginina para L-citrulina e óxido nítrico pela ação das enzimas NOS poderia afetar numerosas funções associadas com uma melhorada capacidade de realizar exercício físico, tais como vasodilatação, hiperemia micro e macrovascular e biogênese mitocondrial (Stamler e Meissner 2001). De modo interessante, os achados de estudos relacionando administração exógena de L-arginina e exercício físico são contraditórios e pouco promissores em adultos saudáveis (Alvares et al, 2011). De fato, em um recente estudo, Bailey et al (2010) notaram que a ingestão de L-arginina ( $6 \text{ g d}^{-1} \times 3 \text{ dias}$ ) combinada com outros aminoácidos e vitaminas foi capaz de aumentar a tolerância (L-arginina  $707 \pm 232$  vs placebo  $562 \pm 145$  s;  $P < 0.05$ ) e eficiência (L-arginina  $1.48 \pm 0.12 \text{ L min}^{-1}$  vs placebo  $1.59 \pm 0.14 \text{ L min}^{-1}$ ;  $P < 0.05$ ) durante exercício físico incremental em ciclo ergômetro. Além disso, uma maior concentração de  $\text{NO}_2^-$  plasmático foi demonstrada. Embora os resultados possam parecer promissores, duas importantes limitações metodológicas foram destacadas no estudo: a primeira diz respeito a falta de mensuração da concentração plasmática de  $\text{NO}_2^-$  antes da ingestão de L-arginina, sendo mensurada somente 60 min pós ingestão, negligenciando assim possíveis diferenças basais na medida; a segunda, por sua vez, refere-se a combinação de outros precursores do óxido nítrico com a L-arginina, como a L-citrulina (Sureda et al, 2009; Hickner et al, 2006) e o suco de beterraba (Bailey et al 2009). Buscando sobrepor as limitações, Vanhatalo et al (2013) repetiram o estudo de Bailey (2010), usando uma suplementação aguda de 6 g L-arginina pura ou 6 g L-arginina plus 25 g de carboidratos, uma vez que a captação de L-arginina poderia ser dependente da insulina (Broglia et al, 2003). Como especulado, ambos os procedimentos de ingestão da L-arginina (pura ou combinada com carboidratos) foram incapazes de resultar em melhorias na produção de óxido nítrico, eficiência, e tolerância ao exercício físico em adultos jovens e saudáveis. Em concordância com os achados supracitados, Liu et al (2008) notaram que a ingestão oral de L-arginina pura ( $6 \text{ g d}^{-1} \times 3 \text{ dias}$ ) não afetou a potência e a capacidade anaeróbica no

exercício físico intermitente em ciclistas treinados. Ainda, nenhuma diferença na concentração plasmática de lactato, amônia,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  foi notada entre os grupos.

Alguns dos poucos efeitos benéficos associados com a suplementação dietética de L-arginina podem ser causadas por vias independentes do óxido nítrico ou por ingredientes presentes nos compostos de L-arginina (Bescos et al 2012). Por exemplo, usando um delineamento randomizado, cruzado e duplo cego, Stevens et al (2000) notaram melhorias no trabalho total (~10%) e resistência à fadiga (~28%) durante teste isocinético após a ingestão de uma mistura composta por 6 g L-arginina plus 2 g glicina plus 3.2 g ácido  $\alpha$  cetoisocapórico, conhecida como GAKIC. Porém, sabe-se que a combinação de L-arginina com glutamato e aspartato é efetivo para reduzir concentrações plasmática de amônia (Denis et al, 1991) e lactato (Schaefer et al, 2002), podendo assim contribuir para os resultados de Stevens et al (2000). Outro exemplo poderia ser o estudo de Buford e Koch (2004), onde usando uma ingestão aguda de 11.2 g GAKIC melhorou a potência média durante uma série de cinco sprints de 10 s com 1 min de intervalo entre séries em ciclo ergômetro. Embora os mecanismos associados a tais achados sejam pouco claros, especula-se que podem estar associados com o aumento na concentração de PCr intramuscular via L-arginina (Minuskin et al 1981). Em resumo, as evidências indicam que a ingestão aguda oral de L-arginina, pura ou combinada, poderiam ter pouco ou nenhum efeito sobre a capacidade de realizar exercício físico em adultos saudáveis, principalmente se treinados.

Usando uma suplementação crônica de L-arginina, pura ou combinada, também não apresenta nenhum efeito sobre a capacidade de realizar exercício físico em adultos saudáveis (Colombani et al, 1999; Abel et al, 2005, Koppo et al, 2009). De fato, usando um grupo de jovens treinados para eventos de longa duração, Abel et al (2005) notaram que após 4 semanas de uma suplementação com uma concentração baixa (5.7 g l-arginina plus 8.7 g aspartato) ou alta (5.7g l-arginina plus 8.7 g aspartato) de l-arginina demonstrou nenhum efeito sobre as respostas fisiológicas durante um exercício físico incremental. De modo similar, Colombani et al (1999) notaram nenhum aumento no tempo para completar 31 km em jovens treinados em endurance usando 15 g de arginina aspartato. Por fim, Koppo et al (2009) notaram nenhum efeito sobre a produção de NO e capacidade em realizar exercício físico, porém com um pequeno aumento na velocidade do componente primário do  $\text{VO}_2$  durante exercício físico moderado. Por outro lado, dois estudos com pacientes portadores de doenças pulmonares (Nagaya et al 2001) e doença arterial periférica (Wilson et al 2007) notaram efeitos benéficos sobre a pressão arterial média e condutividade vascular durante exercício físico. Tais resultados sugerem que a ingestão crônica de L-arginina exógena poderia ser benéfica para pacientes portadores de condições crônicas degenerativas.

## Conclusão

As evidências sobre a administração exógena de L-arginina com referência à produção de NO e desempenho no exercício físico mostram efeitos benéficos desprezíveis em adultos saudáveis, principalmente se treinados para provas de longa duração; porém, em portadores de condições crônicas degenerativas, os efeitos da L-arginina parecem promissores.

## Referências

- Abel T, Knechtle B, Perret C (2005) Influence of chronic supplementation of arginine aspartate in endurance athletes on performance and substrate metabolism: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *Int J Sports Med* 26:334-349
- Alvares TS, Meirelles CM, Bhambhani YN, Paschoalin VM, Gomes PS (2011) L-arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med* 41:233-248
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al (2009) Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol* 107:1144-1155
- Bailey SJ, Winyard PG, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, et al (2010) Acute L-arginine supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of moderate-intensity exercise and enhances high-intensity exercise tolerance. *J Appl Physiol* 109:1394-1403
- Bescos R, Sureda A, Tur JA, Pons A (2012) The effect of nitric oxide related supplements on human performance. *Sports Med* 42:99-117
- Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A, Tsikas D, Frolich JC (1998) L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 46:489-497
- Boger RH (2007) The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 137:1650-1755
- Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, et al (2003) Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4268-4272
- Brunning TA, Hendriks MG, Chang PC, Kuypers EA, Van Zwieten PA (1994) In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans. *Circ Res* 74:912-919
- Buford BN, Koch AJ (2004) Glycine-arginine-alpha-ketoglutaric acid improves performance of repeated cycling sprints. *Med Sci Sports Exerc* 36:583-587
- Colombani PC, Bitzi R, Frey Rindova P (1999) Chronic arginine aspartate supplementation in runners reduces total plasma amino acid level at rest and during a marathon run. *Eur J Nutr* 38:263-270
- Denis C, Dormois D, Linossier MT, Eychenne JL, Hauseux P, Lacour JR (1991) Effect of L-arginine aspartate on the Exercise-induced hyperammonemia in humans: a two periods cross-over trial. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 99:123-127

- Hickner RC, Tanner CJ, Evans CA, (2006) L-citrulline reduces time to exhaustion and insulin response to a graded exercise test. *Med Sci Sports Exerc* 38:660-666.
- Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C (1999) Nitric oxide as a signalling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:879-886
- Liu TH, Wu CL, Chiang CW, Lo YW, Tseng HF, Chang CK (2008) No effect of short-term arginine supplementation on nitric oxide production, metabolism and performance in intermittent exercise in athletes. *J Nutr Biochem* 20:462-46
- Koppo K, Taes YE, Pottier A, Boone J, Bouckaert J, Derave W (2009) Dietary arginine supplementation speeds pulmonary VO<sub>2</sub> kinetics during cycle exercise. *Med Sci Sports Exerc* 41:1626-1632
- Moncada S, Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 147:193-201
- Minuskin ML, Lavine ME, Ulman EA, Fisher H (1981) Nitrogen retention, muscle creatine and orotic acid excretion in traumatized rats fed arginine and glycine enriched diets. *J Nutr* 111:1265-1274
- Nagaya N, Uematsu M, Oya H, Sato N, Sakamaki F, Kyotani S, et al (2001) Short-term oral administration of L-arginine improves hemodynamics and exercise capacity in patients with pre-capillary pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 163: 887-891
- Schaefer A, Piquard F, Geny B, Doutreleau S, Lampert E, Mettauer B, et al (2002) L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. *Int J Sports Med* 23:403-407
- Sellman J, DeRuisseau K, Betters J, Lira VA, Soltow QA, Selsby JT, et al (2006) In vivo inhibition of nitric oxide synthase impairs upregulation of contractile protein mRNA in overloaded plantaris muscle. *J Appl Physiol* 100:258-265
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81:209-237
- Stevens BR, Godfrey MD, Kaminski TW, Braith RW (2000) High intensity dynamic human muscle performance enhanced by a metabolic intervention. *Med Sci Sports Exerc* 32:2102-2108
- Sureda A, Cordova A, Ferrer MD, Tauler P, Perez G, Tur JA, et al (2009) Effects of L-citrulline oral supplementation on polymorphonuclear neutrophils oxidative burst and nitric oxide production after exercise. *Free Radic Res* 6:1-8
- Vanhatalo A, Bailey SJ, DiMenna FJ, Blackwell JR, Wallis GA, Jones AM (2013) No effect of acute L-arginine supplementation on O<sub>2</sub> cost or exercise tolerance. *Eur J Appl Physiol* 113:1805-1819