



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CITRULINA SOBRE
LA RESPUESTA DE RELAJACIÓN EN LA AORTA DE RATAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PATLÁN LOZANO CLAUDIA

**TUTORA DE TESIS:
DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA**



CDMX, JUNIO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Efecto de la administración crónica de citrulina sobre la respuesta de relajación en la aorta de ratas”, que presenté para obtener el título/grado de Química Farmacéutica Bióloga, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Claudia Patlán Lozano'.

**Claudia Patlán Lozano
315203680**

(Nombre completo, firma y número de cuenta)

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: OVALLE MAGALLANES BERENICE
VOCAL: Profesor: CAMPOS BEDOLLA PATRICIA
SECRETARIO: Profesor: GARCÍA DE LA TORRE PAOLA
1er. SUPLENTE: Profesor: FLORES BOCANEGRA LAURA CECILIA
2° SUPLENTE: Profesor: VELÁZQUEZ MOYADO JOSUE ARTURO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS, HOSPITAL DE ESPECIALIDADES, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA

SUSTENTANTE:

CLAUDIA PATLÁN LOZANO

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por abrirme las puertas como la gran institución que es, por acogerme durante estos maravillosos años, por proporcionarme una formación integral y por permitirme crecer académica y profesionalmente.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), porque dentro de sus instalaciones crecí y ahora en estas mismas me brindó la oportunidad de culminar esta etapa de gran manera, en especial, a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas, por brindarme el espacio y los recursos necesarios para lograr este gran objetivo.

A la Dra. Patricia Campos Bedolla, por su paciencia, dedicación, generosidad y apoyo para la realización de este trabajo, por sus palabras de aliento y motivación en los momentos más difíciles y duros.

A la Dra. Paola García De la Torre, por recibirme en el laboratorio y brindarme esta oportunidad, por su amabilidad y cordialidad en todo momento.

CONTENIDO

1.	LISTA DE ABREVIATURAS	6
2.	LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	9
2.1	Índice de figuras	9
2.2	Índice de cuadros	10
3.	RESUMEN.....	11
4.	INTRODUCCIÓN	12
4.1	El sistema cardiovascular	12
4.2	Los mecanismos de contracción y relajación del músculo liso vascular.....	16
4.2.1	Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y las proteínas G	17
4.2.2	Contracción del músculo liso vascular (MLV) y la participación del Ca^{2+}	20
4.2.3	Relajación del músculo liso vascular (MLV) y la participación del Ca^{2+}	21
4.2.3.1	Participación del óxido nítrico en la relajación del músculo liso vascular	22
4.3	L-arginina y la L-citrulina	26
4.3.1	La arginina.....	26
4.3.2	L-citrulina	28
4.3.2.1	Síntesis y metabolismo de L-citrulina.....	29
4.3.2.2	Suplementación de la L-citrulina.....	32
5.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
6.	HIPÓTESIS	39
7.	OBJETIVOS.....	40
7.1	Objetivo General	40
7.2	Objetivos Particulares	40
8.	MATERIALES Y MÉTODO	41
8.1	Animales de estudio	41
8.2	Compuestos químicos	41
8.3	Administración de citrulina.....	42
8.4	Sistema de órganos aislados <i>in vitro</i>	43
8.5	Análisis estadístico	46
9.	RESULTADOS	47
10.	DISCUSIÓN	59
11.	CONCLUSIONES	65

12. PERSPECTIVAS.....	66
13. BIBLIOGRAFÍA.....	67

1. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AC	Adenilil ciclasa
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARGasa	Arginasa
ASL	Argininosuccinato liasa
ASS	Argininosuccinato sintasa
ATP	Adenosín trifosfato
BK_{Ca}	Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺
BH₄	Tetrahidrobiopterina
[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
CAT	Transportador de aminoácidos catiónicos
DAG	Diacilglicerol
EC	Células endoteliales
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EE	Error estándar
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ET-1	Endotelina-1
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FMN	Mononucleótido de flavina
GCs	Guanil ciclasa soluble
GDP	Guanosín difosfato
GLN	Glutamina

GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosín trifosfato
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP₃R	Receptor del inositol 1,4,5-trifosfato
L-NAME	Éster metílico de NG-nitro-L-arginina
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
L-NOARG	N-nitro-L-arginina
L-VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L
MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLV	Músculo liso vascular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NOS	Sintasa del óxido nítrico
OAT	Ornitina aminotransferasa
OCT	Ornitina carbamoil transferasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORN	Ornitina
P5CS	Pirrolina-5-carboxilato sintasa
PAD	Peptidil arginina deiminasa*
PGI₂	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PIP₂	Fosfatidilinositol 1,4 bifosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteína cinasa C

PKG	Proteína cinasa dependiente de GMPc
PLB	Fosfolamban
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática
RKB	Ringer-Krebs-Bicarbonato
ROCC	Canales de calcio operados por receptores
ROCK	Proteína cinasa asociada a Rho
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Sistema cardiovascular
SERCA	Ca ²⁺ /ATPasa del retículo sarcoplásmico
SOCCs	Canales operados por almacenamiento
SR	Retículo sarcoplásmico
TXA2	Tromboxano 2
ua²	Unidades arbitrarias al cuadrado
VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
VSMC	Células del músculo liso vascular
5-HT	Serotonina

2. LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

2.1 Índice de figuras

Figura	Pie de figura
1	Esquema de la estructura morfológica de la aorta.
2	Esquema de las proteínas contráctiles de la célula del músculo liso vascular
3	Representación esquemática del mecanismo de contracción del músculo liso vascular
4	Participación del NO en la regulación de la relajación del MLV
5	Formula desarrollada de la citrulina
6	Síntesis y metabolismo de la L-citrulina
7	Suplementación oral de L-arginina y L-citrulina
8	Esquema de sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> empleado para evaluar la relajación de la aorta de ratas
9	Registro representativo de sistema de órganos aislados <i>in vitro</i>
10	Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por acetilcolina (ACh, 100 mM) en anillos aislados de aorta de ratas macho Sprague Dawley
11	Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh 100 μ M en anillos aislados de aorta de ratas hembra Sprague Dawley
12	Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh 100 μ M en anillos aislados de aorta de ratas macho y hembra Sprague Dawley
13	Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh (0.01 μ M–100 μ M) en anillos aislados de aorta de ratas macho Sprague Dawley

-
-
- | | |
|----|--|
| 14 | Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh (0.01 μ M–100 μ M) en anillos aislados de aorta de ratas hembra Sprague Dawley |
| 15 | Efecto de la citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh (0.01 μ M–100 μ M) en anillos aislados de aorta de ratas macho y hembra Sprague Dawley |
-

2.2 Índice de cuadros

Cuadro	Título
1	Funciones fisiológicas y uso médico potencial de la L-citrulina según experimentos con animales.
2	Compuestos químicos.
3	Descripción de grupos experimentales.
4	Efecto del tratamiento crónico de L-citrulina en la relajación de aorta de rata inducida por ACh (100 μ M) durante 26 minutos. Área bajo la curva.
5	Efecto del tratamiento crónico de L-citrulina en la relajación de aorta de rata inducida por ACh (0.01 μ M - 100 μ M). Área bajo la curva.

3. RESUMEN

El sistema cardiovascular (SC) tiene como principal función el transporte de nutrientes y O_2 a todo el cuerpo, constituido por el corazón y los vasos sanguíneos. La aorta, la arteria más grande del organismo humano, está caracterizada por una capa de íntima, media y adventicia. El endotelio vascular, la capa íntima, posee un papel fisiológico en la modulación del tono de las células del músculo liso vascular (VSMC) mediante la liberación de sustancias vasodilatadores como el óxido nítrico (NO). A partir de L-arginina, por acción de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS), el NO es sintetizado y es el principal responsable de la vasorelajación, contribuyendo al funcionamiento adecuado del endotelio vascular. Cuando las células endoteliales (EC) reducen su capacidad para liberar NO se produce una disfunción endotelial, que puede ser indicador de enfermedades cardiovasculares.

La L-citrulina es un aminoácido utilizado como un fármaco nutriente inocuo, que incrementa la síntesis de L-arginina y por consecuencia, la biodisponibilidad de NO, favoreciendo a la vasodilatación y al adecuado funcionamiento del endotelio. Además, ha demostrado ventajas sobre la suplementación con L-arginina, al ser mejor tolerado gastrointestinalmente y al evitar el metabolismo hepático de primer paso.

Por tal motivo, en el presente trabajo nos propusimos evaluar el efecto de la administración oral crónica de la L-citrulina (3 meses) en la relajación de la aorta de ratas macho y hembra Sprague Dawley adultas (11 meses). Se utilizó un sistema de órganos aislados *in vitro*, donde los anillos de aorta fueron contracturados con Phe (100 μ M) para posteriormente evaluar la relajación inducida por ACh a una concentración única (100 μ M) y una curva acumulativa (0.01-100 μ M). Los resultados más significativos de este trabajo muestran que, en el grupo experimental de hembras tratadas con L-citrulina se produjo una mayor relajación con respecto a las no tratadas. Otro resultado desatado fue que se presentó una mayor relajación por ACh en los anillos de aorta aislados de las hembras tratadas con L-citrulina en comparación con los machos también tratados. Con estos resultados determinamos que la administración oral de la L-citrulina modifica la respuesta de relajación en la aorta de ratas hembra.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 El sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular (SC) tiene como función principal proporcionar y facilitar el transporte de nutrientes y O₂ a los tejidos del cuerpo., así como, la eliminación de los productos de desecho, como el CO₂. Está constituido por el corazón y los vasos sanguíneos, los cuales comprenden a las arterias, arteriolas, venas, vénulas y capilares (Aaronson *et al.*, 2020).

La función principal de las arterias es transportar sangre oxigenada desde el corazón a la periferia del cuerpo. Las arterias que van disminuyendo de tamaño conducen la sangre hacia las arteriolas y, finalmente, a los capilares sanguíneos, donde se produce el intercambio de nutrientes y gases entre la sangre y los tejidos. Los capilares están estrechamente envueltos por células de músculo liso vascular (VSMC, por sus siglas en inglés) que confieren acción contráctil y suministran sangre de manera directa a los tejidos por un proceso de perfusión. Las arteriolas son filamentos elásticos, resultan de ramificaciones de las arterias, se extienden hacia el interior del tejido, cumpliendo con funciones de anclaje. Las venas se conectan a las arterias por medio de los capilares, su principal función es colectar la sangre desoxigenada y transportarla de vuelta al corazón. Finalmente, las vénulas son los vasos que conducen la sangre desde los capilares hacia las venas (Geiger, 2019).

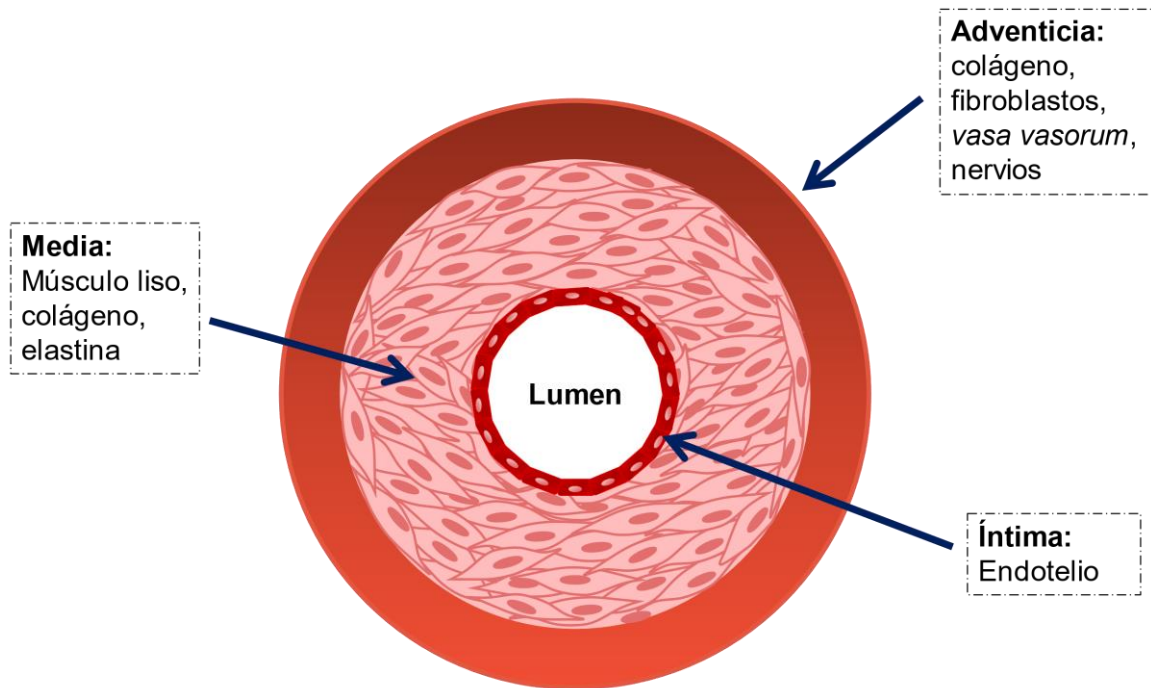
La aorta es la arteria más grande del cuerpo humano. Se divide en los segmentos torácico y abdominal, dependiendo de la localización con respecto al diafragma. La aorta torácica se divide en aorta ascendente, arco aórtico y aorta torácica descendente. La aorta torácica empieza como una estructura anterior, en dirección superior hacia el esternón y se desplaza en dirección posterior entrando en el mediastino. La aorta torácica descendente se localiza posterior al esófago y anterior a la columna vertebral (Dieter *et al.*, 2019; Klabunde, 2021; Topo *et al.*, 2008).

La estructura morfológica de la aorta, al igual que los vasos sanguíneos arteriales y venosos, se compone por tres capas o tunicas (**Fig. 1**): íntima, media y adventicia (Klabunde, 2021).

La túnica íntima es una capa fina interna conformada por una monocapa de células endoteliales delgadas, denominada también endotelio, que se encuentra sostenida por tejido conectivo. Las células endoteliales tienen uniones estrechas entre sí, impidiendo que moléculas grandes difundan por el endotelio. Las células endoteliales desempeñan un papel importante en el control de la permeabilidad vascular, contracción, relajación, angiogénesis y regulación de la homeostasis (Aaronson *et al.*, 2020; Klabunde, 2021).

La túnica media se separa de la túnica íntima por la lámina elástica interna, conformada principalmente de elastina. La túnica media comprende las células del músculo liso, unidas por una matriz extracelular, compuesta principalmente por componentes elásticos y no elásticos como colágeno, elastina y glicoproteínas. Las células musculares adyacentes son áreas de contacto celular, donde canales iónicos favorecen el paso de los iones de una célula a otra, donde las células del músculo liso forman un *sincitio*. La capa media de la aorta se caracteriza por ser de un gran grosor al ser abundante en músculo liso y fibras elásticas. La aorta es tan gruesa que requiere su propia red capilar nutritiva, denominada *vasa vasorum* (Aaronson *et al.*, 2020; Afewerki *et al.*, 2019; Consigny, 1991; Dieter *et al.*, 2019; Klabunde, 2021).

Finalmente, la túnica adventicia se separa de la media por una lámina elástica externa. La túnica adventicia contiene colágeno que soporta fibroblastos, *vasa vasorum*, el cual proporciona nutrientes a la pared exterior del vaso, y los nervios autónomos, principalmente a los adrenérgicos simpáticos (Consigny, 1991; Klabunde, 2021).



Realizado por Claudia Patlán en PowerPoint

Figura 1. Esquema de la estructura morfológica de la aorta. La aorta se encuentra constituida por tres capas: íntima, media y adventicia. Vista transversal.

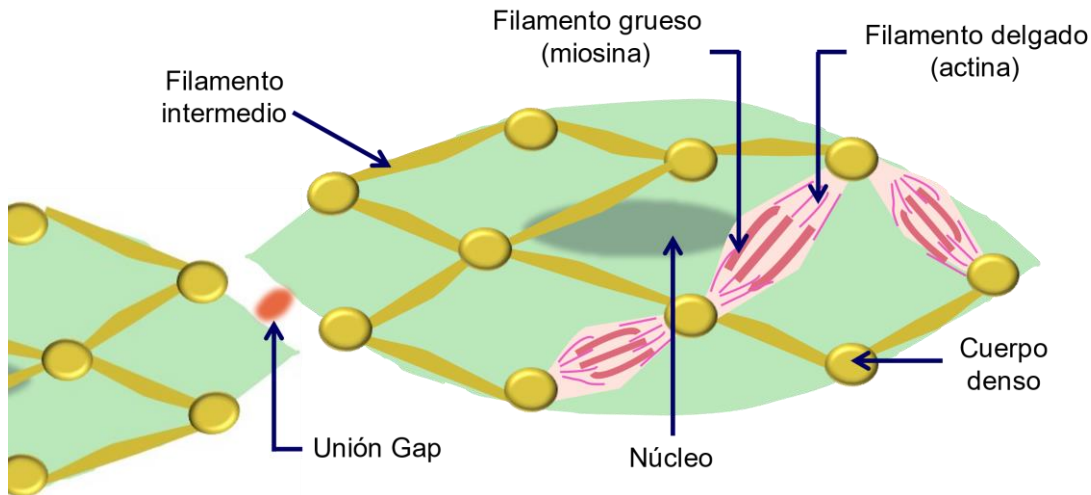
Las VSMC conforman al músculo liso vascular (MLV), siendo parte de la capa media de los vasos (**Fig. 1**), tienen una función fisiológica significativa en la regulación del tono vascular dado a que expresan diferentes genes y proteínas importantes para los mecanismos de contracción y relajación vascular, permitiendo la regulación del diámetro del lumen del vaso, ayudan al mantenimiento de la presión arterial normal y proporcionan estabilidad estructural. Se caracterizan por tener forma de huso o fusiformes y son alargadas, miden de 5 a 10 μm de diámetro, van desde los 50 a los 400 μm de largo y poseen un núcleo central (Gao, 2022; Keynes *et al.*, 2011).

La contracción de las VSMC se regula por la presencia de las proteínas contráctiles miosina y actina, proteínas que se organizan en filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina dispuestos en el citoplasma (**Fig. 2**). A diferencia de las células del músculo estriado, no muestran estrías, ni sarcómeros

y usan la energía liberada por la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) (Keynes *et al.*, 2011; Webb, 2003).

En los filamentos del MLV, existen dos principales isoformas de actina: α - y γ - actina, que se unen para formar dos cadenas paralelas entre sí, conformando una estructura helicoidal. Los filamentos delgados se conectan por cuerpos densos en el citoplasma y se adhieren a las placas de unión en la membrana celular (Aguilar & Mitchell, 2010).

Los filamentos gruesos del músculo liso están formados por moléculas de miosina tipo II, que constan de dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas se tuercen ligeramente, conformando cada una, una cabeza globular. Las cuatro cadenas ligeras se unen a las cabezas de miosina formando una estructura larga de doble hélice. Cada filamento de miosina está rodeado por varios filamentos de actina. El movimiento en el músculo liso es generado por los puentes cruzados de miosina, que interactúan con los filamentos delgados de actina. (Aguilar & Mitchell, 2010; Consigny, 1991; Keynes *et al.*, 2011).



(Modificado de Keynes, 2011)

Figura 2. Esquema de las proteínas contráctiles de la célula del músculo liso vascular. Las proteínas contráctiles del MLV son los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina, conectados por los cuerpos densos. Las células se comunican con células adyacentes a través de la unión Gap. MLV: músculo liso vascular.

4.2 Los mecanismos de contracción y relajación del músculo liso vascular

El músculo liso de los vasos sanguíneos se encuentra en un estado parcialmente contraído, lo que determina el diámetro del vaso en reposo. En condiciones fisiológicas, el desencadenante de una contracción de las VSMC es el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), el cual puede derivar de dos procesos, descritos a continuación (Consigny, 1991; Somlyo & Somlyo, 1994; Somlyo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2015):

- Acoplamiento electromecánico. Debido a los cambios en el potencial de la membrana por una despolarización, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC, por sus siglas en inglés) se abren, permitiendo la entrada de Ca^{2+} , aumentando la concentración intracelular de este ion.
- Acoplamiento farmacomecánico. De manera general, este mecanismo está dado por la unión de un neurotransmisor o de un agonista con su receptor de la membrana, por consecuencia se producen segundos mensajeros que provocan la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico

(SR, por sus siglas en inglés) inducida por el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃, por sus siglas en inglés).

Con este segundo proceso, se desencadena una vía de transducción de señales que involucra a los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) y las proteínas G heterotriméricas. Los GPCR se caracterizan por responder a estímulos extracelulares como hormonas y neurotransmisores para transmitir dichas señales al interior de la célula (Calebiro *et al.*, 2021; Gao, 2022).

4.2.1 Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y las proteínas G

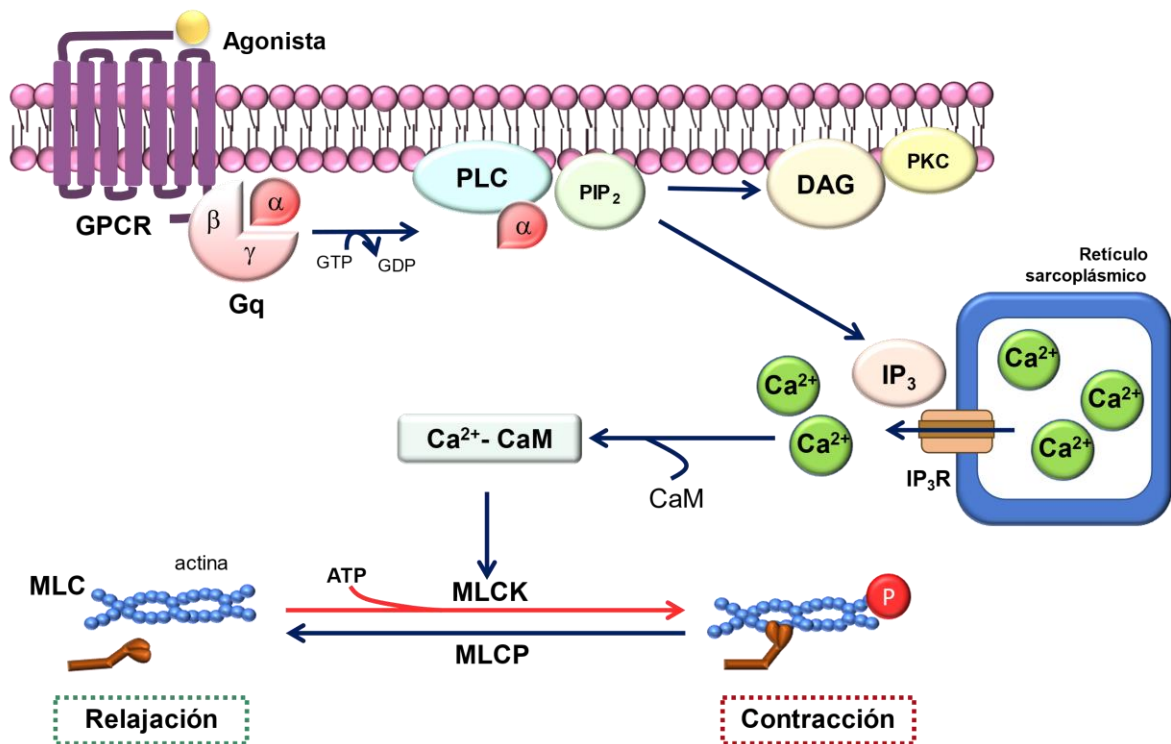
Los GPCR son la clase más grande de proteínas de membrana. Se caracterizan por ser proteínas integrales de membrana, con una estructura de siete dominios transmembranales que proporcionan un sitio de unión a los ligandos (TM1-TM7) unidos por tres bucles extracelulares (ECL1-ECL3) y tres bucles intracelulares (ICL1-ICL3), con un extremo N extracelular y un extremo C intracelular (Alexander *et al.*, 2019; Calebiro *et al.*, 2021; Venkatakrisnan *et al.*, 2013)

Los GPCR interactúan con las proteínas G en la membrana plasmática. En el momento que una molécula de señalización externa se une a un GPCR, provoca un cambio conformacional en éste. Este cambio, desencadena la interacción entre el GPCR y una proteína G.

Las proteínas G son proteínas heterotriméricas; es decir, se conforman por tres subunidades: α , β y γ . En su estado inactivo o de reposo, la subunidad α ($G\alpha$) se encuentra unida al guanósín difosfato (GDP, por sus siglas en inglés) y asociada con el dímero $G\beta\gamma$. En cuanto un agonista se une a un GPCR, se produce un estado activo, donde el GDP se disocia de la subunidad α y es reemplazado por guanósín trifosfato (GTP, por sus siglas en inglés), la unión de GTP a la subunidad α induce un cambio conformacional, que trae como consecuencia la disociación de la subunidad $G\alpha$ del complejo $G\beta\gamma$ (Latek *et al.*, 2012; Offermanns, 2003; Purves *et al.*, 2001).

Las proteínas G se dividen en cuatro subfamilias basados por su similitud en su secuencia de aminoácidos y en su función: $G_{q/11}$, G_s , G_i y $G_{12/13}$. Todas son proteínas que desempeñan un rol importante en la regulación de diferentes sistemas de transducción de señales, incluidos el sistema adenilil ciclasa (AC)/adenosín monofosfato cíclico (AMPC, por sus siglas en inglés), implicado en la regulación del tono vascular (Bassil & Anand-Srivastava, 2007; Calebiro *et al.*, 2021; McCudden *et al.*, 2005).

La proteína $G_{q/11}$ promueve la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés), la cual activa al fosfatidilinositol 1,4 bifosfato (PIP_2 , por sus siglas en inglés), generando la formación de dos segundos mensajeros, el IP_3 y el diacilglicerol (DAG, por sus siglas en inglés). El IP_3 se une al receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R , por sus siglas en inglés) que se encuentran en la membrana del SR, favoreciendo la liberación de Ca^{2+} al citosol y por consecuencia incrementando la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, el cual se une a la calmodulina formando así el complejo Ca^{2+} -calmodulina y activando a la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK, por sus siglas en inglés). Mientras que, el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), que activa a la proteína CPI-17, e inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP, por sus siglas en inglés), promoviendo la contracción (Bastin & Heximer, 2011) (**Fig. 3**).



(Modificado de Consigny, 1991; Hofmann *et al.*, 2000).

Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de contracción del músculo liso vascular. La unión de un agonista al receptor transmembranal provoca que la subunidad α de la proteína Gq active a la PLC, que escinde al PIP_2 formando DAG e IP_3 . PIP_2 actúa sobre IP_3R liberando el Ca^{2+} del SR. El incremento del Ca^{2+} intracelular favorece la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina, el cual activa a MLCK. La MLCK activa, fosforila la MLC, favoreciendo la formación de puentes cruzados entre las cabezas de miosina y filamentos de actina, dando como resultado la contracción del MLV. El DAG formado activa a la proteína PKC, que actúa sobre CPI-17, con un rol inhibitorio sobre la MLCP, favoreciendo la contracción. PLC: fosfolipasa C, PIP_2 : fosfatidilinositol 1,4 bifosfato, DAG: diacilglicerol, IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato, IP_3R : receptor inositol 1,4,5-trifosfato, MLCK: cinasa de cadena ligera de miosina, MLC: cadena ligera de miosina, PKC: proteína cinasa C, MLCP: fosfatasa de cadena ligera de miosina.

La activación de la proteína G_s estimula la activación de la AC que se encuentra unida a la membrana, la que cataliza la formación del AMPc intracelular a partir de ATP y una posterior activación de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc. El AMPc disminuye la fosforilación de la MLCK, evitando que el complejo Ca^{2+} -calmodulina se active, inhibiendo así las interacciones entre la actina y la miosina provocando la relajación del MLV (Althoff & Offermans, 2015; Bastin & Heximer, 2011; Peters & Michel, 2003).

La proteína G_i presenta tres isoformas diferentes de $G_{i\alpha}$ - $G_{i\alpha-2}$, $G_{i\alpha-2}$ y $G_{i\alpha3}$, codificado por tres genes distintos. Estas tres isoformas están relacionadas con la regulación de la inhibición de la AC, lo que reduce la generación de AMPc y la activación de canales de K^+ (Althoff & Offermans, 2015; Bassil & Anand-Srivastava, 2007).

La proteína $G_{12/13}$ está vinculada con la activación por la unión de GTP a RhoA, la cual estimula a la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK, por sus siglas en inglés) que fosforila e inhibe a MLCP, y al inhibirla se favorece la contracción (Althoff & Offermans, 2015; Gohla *et al.*, 2000; Jalil *et al.*, 2005).

4.2.2 Contracción del músculo liso vascular (MLV) y la participación del Ca^{2+}

El Ca^{2+} es un ion que participa como mensajero intracelular en la señalización del MLV. En las VSMC las concentraciones basales de $[Ca^{2+}]_i$ oscilan entre 100-150 nM, mientras que la $[Ca^{2+}]_o$ en los depósitos intracelulares y en el espacio extracelular son mayores a 5-10 mM y 2 mM, respectivamente, creando un gran gradiente químico a favor de la entrada de Ca^{2+} en el citosol.

El ingreso de Ca^{2+} extracelular puede ser regulado por diferentes vías, principalmente a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (L-VDCC, por sus siglas en inglés), los cuales dependen de la despolarización de la membrana, permitiendo la entrada de Ca^{2+} y por consecuencia, ocurriendo la contracción. Así también, por los canales de calcio operados por receptores (ROCC, por sus siglas en inglés), los cuales son activados por agonistas y los canales

operados por almacenamiento (SOCCs, por sus siglas en inglés) que son activados por un decremento de Ca^{2+} del SR (Berridge *et al.*, 2003; Reyes-García *et al.*, 2018).

Con la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se forma el complejo Ca^{2+} -calmodulina, el cual activa a la MLCK, la cual fosforila la cadena ligera de miosina (MLC, por sus siglas en inglés). La miosina fosforilada forma puentes cruzados. El ciclo de los puentes cruzados inicia cuando la cabeza de la miosina se une a los filamentos delgados de la actina. Posteriormente, por la unión del ATP a la cabeza de la miosina, se produce un cambio conformacional lo que induce la pérdida de la afinidad de la miosina por la actina (Aaronson *et al.*, 2020; Consigny, 1991; Klabunde, 2021).

La actividad de ATPasa de la miosina II, hidroliza ATP para formar adenosín difosfato (ADP, por sus siglas en inglés) y P_i , reacción que proporciona la energía necesaria para la contracción muscular. La cabeza de la miosina vuelve a unirse al filamento de la actina, diferente a la posición inicial. El ciclo finaliza con el regreso a la posición inicial y desplazando el filamento de la actina (Gao, 2022).

4.2.3 Relajación del músculo liso vascular (MLV) y la participación del Ca^{2+}

La relajación del MLV ocurre por la inhibición del estímulo de contracción o la acción directa de un mecanismo de relajación. Indistintamente, la relajación se da por una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la reducción de la actividad de la MLCK y/o una mayor actividad de la MLCP. Asimismo, puede deberse a los mecanismos de señalización asociados a la activación de la proteína Gs (Consigny, 1991; Webb, 2003).

Como hemos comentado previamente que, un decremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ trae como consecuencia la relajación de las VSMC. Los principales mecanismos responsables de este decremento son la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés) y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés). Ambas ATPasas, por la hidrólisis del ATP, permiten el movimiento de iones Ca^{2+} a través de las membranas biológicas (Brini, 2013; Periasamy & Kalyanasundaram, 2007).

En la membrana plasmática existe el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que participa también a disminuir el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En células en reposo, por cada ion Ca^{2+} que sale, entran tres de Na^+ . Mientras que, en células activas actúa de modo inverso, por cada tres iones de Na^+ que salen, entra uno de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mantiene la producción de NO, dando como resultado una relajación dependiente del endotelio (Berra-Romani *et al.*, 2010).

Existen otros mecanismos relacionados con la relajación del MLV, que están vinculados con la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA, por sus siglas en inglés). La fosforilación del IP_3 por PKA ocasiona un decremento de la salida de Ca^{2+} del SR. Mientras que, la PKG al fosforilar fosfolamban (PLB, proteína que inhibe la actividad de SERCA) promueve el ingreso del Ca^{2+} al SR, disminuyendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La PKA al fosforilar la MLCK, disminuye la afinidad del complejo Ca^{2+} - calmodulina, reduciendo su actividad (Berra-Romani *et al.*, 2010).

4.2.3.1 Participación del óxido nítrico en la relajación del músculo liso vascular

El óxido nítrico (NO) es una molécula mediadora endógena de señalización, que se produce en una gran variedad de células. El NO participa en diversas funciones biológicas importantes, como la neurotransmisión, la vasodilatación, la inmunotoxicidad y la transducción de señales. Una de las funciones más relevantes es que contribuye a la regulación de la contracción y la relajación de los vasos sanguíneos (Moncada *et al.*, 1991; Vanhoutte *et al.*, 2016).

La producción del NO es uno de los principales mecanismos implicados en el funcionamiento apropiado del endotelio, regulación del tono vascular y contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared arterial previniendo la filtración de leucocitos y formación de trombos y angiogénesis (Martínez-Augustin, 2004; Ochiai *et al.*, 2012)

Una disminución de la producción de NO puede provocar disfunción celular, disminución del flujo sanguíneo y del transporte de glucosa, resistencia a la insulina, hipertensión y diabetes. Estudios experimentales y clínicos han definido que la

disminución de producción de NO promueve enfermedades cardiovasculares (ECV) y enfermedades metabólicas, causando importantes alteraciones fisiológicas (Rodrigues-Krause *et al.*, 2012).

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, por la acción de la enzima sintasa del óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés) (Palmer *et al.*, 1988). La NOS comprende tres isoformas distintas: NOS neuronal (NOS 1 o nNOS) en células neuronales del cerebro en neuronas no adrenérgicas, no colinérgicas; NOS inducible (NOS-2 o iNOS) inducida por macrófagos en respuesta a una elevada secreción de citocinas y NOS endotelial (NOS-3 o eNOS) producida por las células endoteliales. La isoforma eNOS está expresada mayoritariamente en las células endoteliales, como un mediador significativo para mantener la función e integridad del endotelio y regula la función vascular (Dimitris *et al.*, 2012)

Todas las isoformas de NOS utilizan a la L-arginina como sustrato, y oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) como co-sustratos, mientras que el dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y tetrahidrobiopterina (BH₄) son cofactores. (Sanders *et al.*, 2000; Fosterman & Munzel., 2006; Förstermann & Sessa, 2012; Zhao *et al.*, 2015).

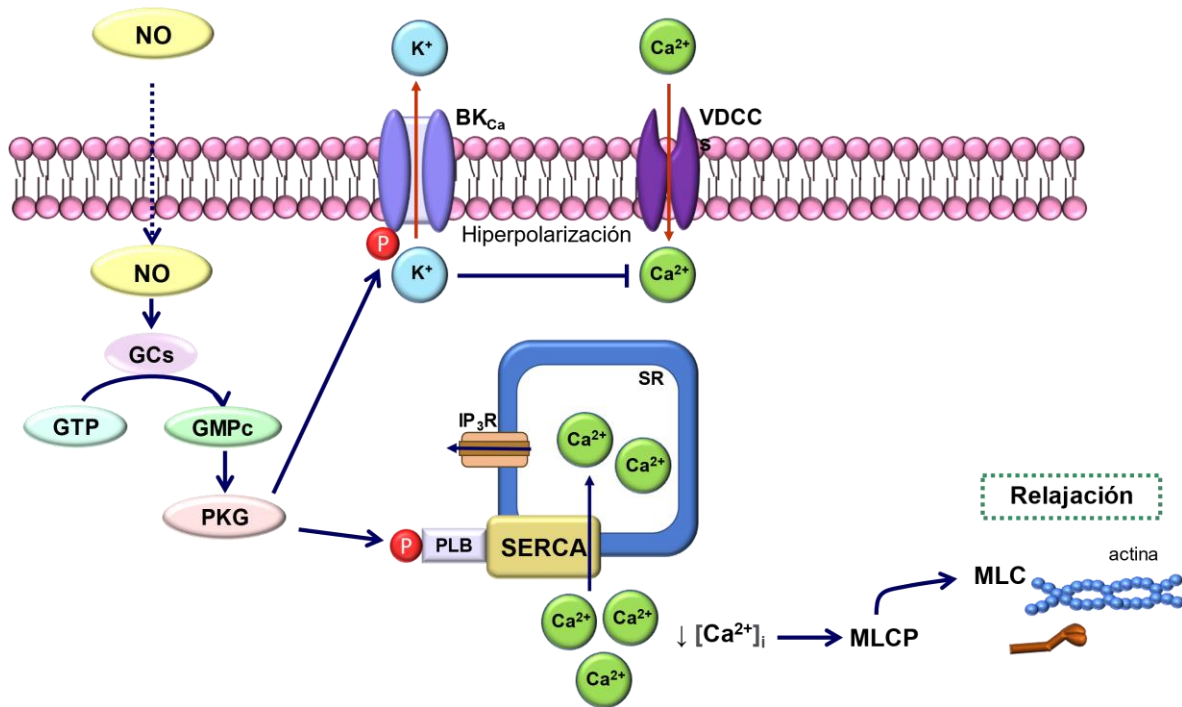
Los monómeros NOS son capaces de transferir electrones desde NADPH, hasta FAD y mononucleótido de flavina (FMN) y tienen capacidad limitada para reducir el oxígeno molecular (O₂) a superóxido (O₂⁻) (Förstermann & Sessa, 2012).

La desregulación o la sobre expresión de cualquiera de las tres isoformas de NOS, eNOS, iNOS y nNOS, está involucrada en procesos patológicos, como la aterosclerosis, hipertensión, inflamación, cáncer, sepsis o hipoxia (Cinelli *et al.*, 2020; Förstermann & Sessa, 2012).

A nivel intracelular, el NO generado a partir de L-arginina mediante la NOS activa la guanil ciclasa soluble (GCs). El NO se puede producir mediante una NOS dependiente de Ca²⁺/calmodulina en una célula endotelial adyacente. La GCs produce un cambio conformacional en el sitio catalítico e incrementa la conversión de GTP a guanosín monofosfato cíclico (GMPc). Asimismo, la GMPc activa a la

proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG, por sus siglas en inglés), la cual fosforila canales de K^+ activados por Ca^{2+} (BKCa) provocando una hiperpolarización de la membrana, inhibiendo la entrada de Ca^{2+} por los VDCCs. Del mismo modo, PKG promueve la recaptura del Ca^{2+} al SR y como consecuencia, la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ induce la relajación (Aaronson *et al.*, 2020; Burgoyne & Eaton, 2010; Gao, 2022; Hofmann *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2015). Además, la actividad de SERCA está regulada por la PLB, que en su estado desfosforilado, inhibe a SERCA y el transporte de Ca^{2+} al SR (**Fig. 4**).

En conclusión, la producción del NO está regulada por la disponibilidad de L-arginina y L-citrulina., una mayor disponibilidad del NO podría evitar una disfunción del tono vascular de los vasos sanguíneos.



(Modificado de Consigny, 1991)

Figura 4. Participación del NO en la regulación de la relajación del MLV. El NO proveniente del endotelio difunde a través de la membrana de la célula estimulando a la GCs, la cual favorece la síntesis de GMPc a partir de GTP. El GMPc activa a la PKG, la cual fosforila a los canales BK_{Ca}, sale el K⁺ y ocurre la hiperpolarización de la membrana, inhibiendo a los VDCC y la entrada de Ca²⁺ al citosol. Además, PKG fosforila a PLB favoreciendo la actividad de SERCA que secuestra el Ca²⁺ del citosol al SR. GMPc: guanosín monofosfato cíclico, NO: óxido nítrico, GCs: guanil ciclasa soluble, GTP: guanosín trifosfato, PKG: proteína cinasa dependiente de GMPc, BK_{Ca}: canales de K⁺ activados por Ca²⁺, VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje, IP₃R: receptor inositol 1,4,5-trifosfato, SR: retículo sarcoplásmico, PLB: Fosfolamban, SERCA: Ca²⁺/ATPasa del sarco/retículo sarcoplásmico, MLCP: fosfatasa de cadena ligera de miosina, MLC: cadena ligera de miosina

4.3 L-arginina y la L-citrulina

4.3.1 La arginina

La arginina (L-arginina) es un aminoácido condicionalmente esencial, que actúa como sustrato para la síntesis de proteínas y participa en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la vasodilatación, secreción hormonal, respuestas inmunitarias, neurotransmisión, adhesión de plaquetas y leucocitos. Representa el 14% del nitrógeno total en las proteínas corporales, por lo que sus requerimientos y consumo adecuado a lo largo de la vida es crucial para la salud (Wu *et al.*, 2021).

La L-arginina es un precursor para la síntesis de urea, poliaminas, fosfato de creatina y proteínas (Mori & Gotoh, 2000). También, participa como un precursor para la formación del NO y L-citrulina por la actividad catalítica de NOS en presencia de O₂ y NADPH (Gambardella *et al.*, 2020).

La L-arginina se puede sintetizar a partir de la L-citrulina, por acción de diferentes enzimas (Szefel *et al.*, 2019). El intestino y el hígado son los principales órganos donde se sintetiza L-arginina y el riñón es otro sitio de síntesis (Bescós *et al.*, 2012), realizando el transporte de la L-arginina de la sangre a las células por el transportador de aminoácidos catiónicos (CAT) (Mori & Gotoh, 2000).

Las concentraciones fisiológicas de L-arginina plasmáticas son de 70 a 115 µM/L en personas adultas sanas, mientras que estas concentraciones disminuyen conforme incrementa la edad (Bescós *et al.*, 2012; Szefel, 2019; Gonzalez, 2023).

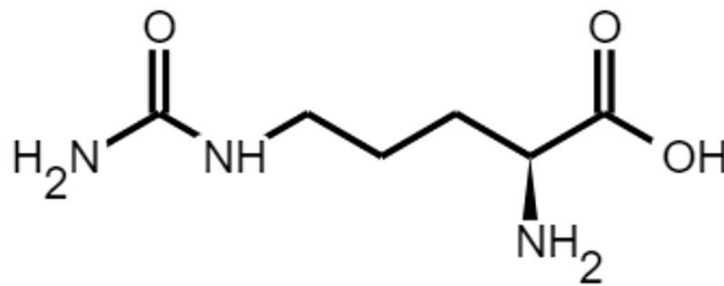
La deficiencia de L-arginina y por consecuencia, la ausencia de biodisponibilidad del NO, se han relacionado con enfermedades cardiovasculares como hipertensión, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, resistencia a la insulina (Martínez-Augustin, 2004). También, induce el incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), principalmente de superóxido (O₂⁻), que pueden reducir la biodisponibilidad de NO a través de la generación de peroxinitrito (ONOO⁻), promoviendo la disfunción endotelial (Allerton, 2018).

La disfunción endotelial constituye cualquier alteración de la fisiología del endotelio que produzca un desequilibrio de las funciones del endotelio, como la regulación de la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea, la modulación del tono vascular, la regulación de la proliferación de las células de músculo liso y la capacidad de reclutar células sanguíneas. Es decir, cualquier evento que altere la homeostasis del endotelio. La capacidad del endotelio para regular la homeostasis vascular depende de la producción de NO y cualquier disminución en la síntesis de NO puede provocar una insuficiencia vasodilatadora endotelial, como un signo de disfunción endotelial. (Martínez-Augustin, 2004; Versari, 2009). La disfunción endotelial es una causa principal asociada en las enfermedades cardiovasculares, cualquier alteración puede ser un predictor de dichas patologías.

En resumen, una apropiada síntesis de L-arginina permite la producción de NO favoreciendo a una adecuada función endotelial vascular.

4.3.2 L-citrulina

La citrulina (L-citrulina) ($C_6H_{13}N_3O_3$) es un aminoácido neutro, no esencial y no proteico (**Fig. 5**), el cual es un intermediario en el ciclo de la urea y un precursor endógeno de la síntesis de L-arginina. Igualmente, participa en la regulación y producción del NO, posee propiedades antioxidantes y vasodilatadoras. Teniendo entonces, una enorme importancia en el metabolismo celular (Gonzalez *et al.*, 2023; Maric *et al.*, 2021; Romero *et al.*, 2006).



(Realizada en Biomodel, 2024)

Figura 5. Formula desarrollada de la citrulina.

La L-citrulina obtiene su nombre científico de la sandía, *Citrullis vulgaris*, de donde fue aislada por primera vez al encontrarse en altas concentraciones. También está presente en una menor concentración en otros frutos, como el pepino, el melón y la calabaza, (Curis *et al.*, 2005). El aislamiento de la citrulina del jugo de la sandía fue realizado por primera vez en 1930, aunque se ha propuesto que el primer aislamiento fue por Koga & Ohtake en 1914 (Joshi *et al.*, 2019).

Se ha reportado que las concentraciones que la L-citrulina plasmática son de aproximadamente 20-40 $\mu\text{mol/L}$ en individuos sanos (Papadia *et al.*, 2018; Bahadoran *et al.*, 2020).

Al ser un aminoácido no proteico, la L-citrulina se incorpora a las proteínas por modificaciones postraduccionales en los residuos de L-arginina, este proceso se denomina citrulinación o desaminación. Este implica que, la actividad de la

enzima peptidil arginina deiminasa (PAD) cause la escisión hidrolítica y conversión de L-arginina en L-citrulina y un ion amonio NH_4^+ (Romero *et al.*, 2006; Maric *et al.*, 2021).

4.3.2.1 Síntesis y metabolismo de L-citrulina

El intestino delgado, donde se encuentran los enterocitos, contribuye de forma significativa en los niveles circulantes de la L-citrulina, dependiente del ciclo proximal de la urea en el intestino. Por ello, el intestino es el sitio principal de la biosíntesis de la L-citrulina, del 60 al 90% de la L-citrulina encontrada en plasma proviene de esta fuente. Otra fuente importante es la producida en el hígado (hepatocitos) originada como intermediario del ciclo de la urea (**Fig. 6**) (Curis *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2006; Bahadoran *et al.*, 2021; Maric, 2021).

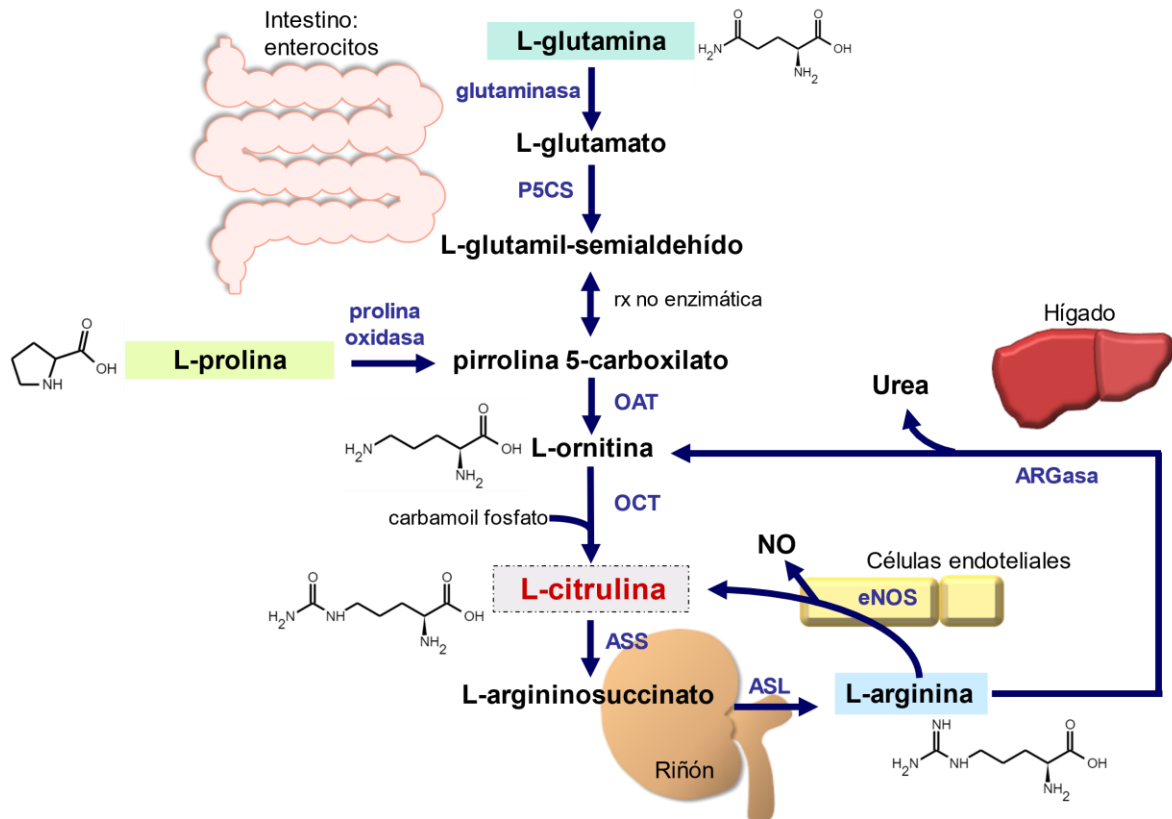
La glutamina (GLN) es el principal precursor de la síntesis de la L-citrulina intestinal y sirve como sustrato en la síntesis *de novo* de la L-arginina en mamíferos, a través de la enzima de la glutaminasa, formando glutamato. Posteriormente, la enzima pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) forma un intermediario, el L-glutamil-semialdehído para formar a la pirrolina 5-carboxilato. Consecutivamente, la enzima ornitina aminotransferasa (OAT) participa en la formación de la ornitina (ORN), principal precursor en la biosíntesis de L-citrulina (Curis *et al.*, 2005; Bahadoran *et al.*, 2021; Maric, 2021).

El catabolismo del aminoácido prolina, procedente de la dieta, también participa en el suministro de la ORN a través de la enzima prolina oxidasa, formando P5CS. Asimismo, la L-arginina por actividad de la arginasa (ARGasa) formará urea y ORN, contribuyendo también a la formación de ORN. A partir de la ORN formada, en la matriz mitocondrial de los enterocitos y hepatocitos, se produce L-citrulina por acción de la enzima ornitina carbamoil transferasa (OCT), usando como sustrato a carbamoil fosfato (Curis *et al.*, 2005; Bahadoran *et al.*, 2021; Maric, 2021).

Posterior a la liberación de la L-citrulina, es captada y metabolizada por las células del túbulo renal proximal del riñón, la enzima argininosuccinato sintasa

(ASS) convierte a la L-citrulina en L-argininosuccinato. A continuación, la argininosuccinato liasa (ASL) forma la L-arginina que se libera a la circulación sistémica para que sea utilizada por los tejidos periféricos (**Fig. 6**) (Bahadoran *et al.*, 2021; Maric, 2021).

La síntesis de L-citrulina también puede ocurrir por la actividad enzimática de NOS, funcionando como sustrato a la L-arginina y, además, formando NO. Sin embargo, en condiciones normales la actividad de NOS no contribuye significativamente al flujo de L-citrulina en todo el cuerpo (Romero *et al.*, 2006).



(Modificado de Curis, 2015)

Figura 6. Síntesis y metabolismo de la L-citrulina. En los enterocitos, la L-citrulina se sintetiza a partir de la L-glutamina, donde por acción de la glutaminasa se forma L-glutamato, por una serie de reacciones enzimáticas se forma L-ornitina, la cual se convierte en L-citrulina por acción de la ornitina carbamoiltransferasa (OCT). La L-ornitina también se puede formar a partir del catabolismo de la L-prolina, por la prolina oxidasa. La L-citrulina es metabolizada en el riñón, y por acción de la argininosuccinato sintasa (ASS) y la argininosuccinato liasa (ASL), se convierte en L-arginina que se libera a la circulación. Otra vía a partir de la L-arginina, es la formación de NO y L-citrulina por acción de la NOS, también la ARGasa puede catabolizar a la L-arginina en urea y en L-ornitina. P5CS: pirrolina-5-carboxilato sintasa, rx: reacción, OAT: ornitina aminotransferasa, OCT: ornitina carbamoiltransferasa, ASS: argininosuccinato sintasa, ASL: argininosuccinato liasa, NOS: sintasa de óxido nítrico, NO: óxido nítrico, ARGasa: arginasa

4.3.2.2 Suplementación de la L-citrulina

La L-arginina ha sido utilizado para incrementar la producción de NO a través de la NOS, lo que permite la restauración de los niveles de NO a nivel celular, favoreciendo la vasodilatación y la perfusión muscular, mejorando el aporte de nutrientes/oxígeno durante el ejercicio y regulando la proliferación normal de las VSMC (Alvares *et al.*, 2011; Sanders *et al.*, 2000).

No obstante, se ha reportado en personas sanas que, la administración de L-arginina durante una semana no incrementa la producción de NO, evaluado a través de la medición de dos indicadores NO^{-2} y NO^{-} (Evans *et al.*, 2004; Alvares, 2012). De este modo, se determinó que la suplementación de L-arginina no es tan efectiva en la producción de NO. Esto es debido a que, al ser ingerida por vía oral, la L-arginina sufre un alto metabolismo de primer paso, es catabolizada por la enzima ARGasa en el intestino, la cual la hidroliza a ORN y urea, dando como resultado bajos niveles de L-arginina en el plasma y reduciendo su biodisponibilidad como sustrato para la síntesis de NO (**Fig. 7**) (Luiking *et al.*, 2010; González *et al.*, 2023). Además, Grimble (2007) reporta efectos secundarios con la suplementación oral con L-arginina (>10 g) de tipo gastrointestinal como náuseas, diarrea y dolor abdominal.

Schulman *et al.*, (2006) realizaron un estudio clínico con 156 pacientes con un infarto agudo de miocardio a los que se les administró L-arginina y placebo. Estos autores reportaron que, cuando se administraba L-arginina no había beneficios en las mediciones de la rigidez vascular o la fracción de eyección, comparada con las terapias postinfarto estándar. Además, la administración de L-arginina estaba asociada con una mayor mortalidad postinfarto. Por lo que, estos autores sugirieron que no era seguro administrar L-arginina después de un infarto agudo de miocardio (Schulman *et al.*, 2006).

Por ello, fue necesario la búsqueda de otras alternativas más seguras y eficaces para incrementar la biodisponibilidad y las concentraciones plasmáticas de L-arginina y NO.

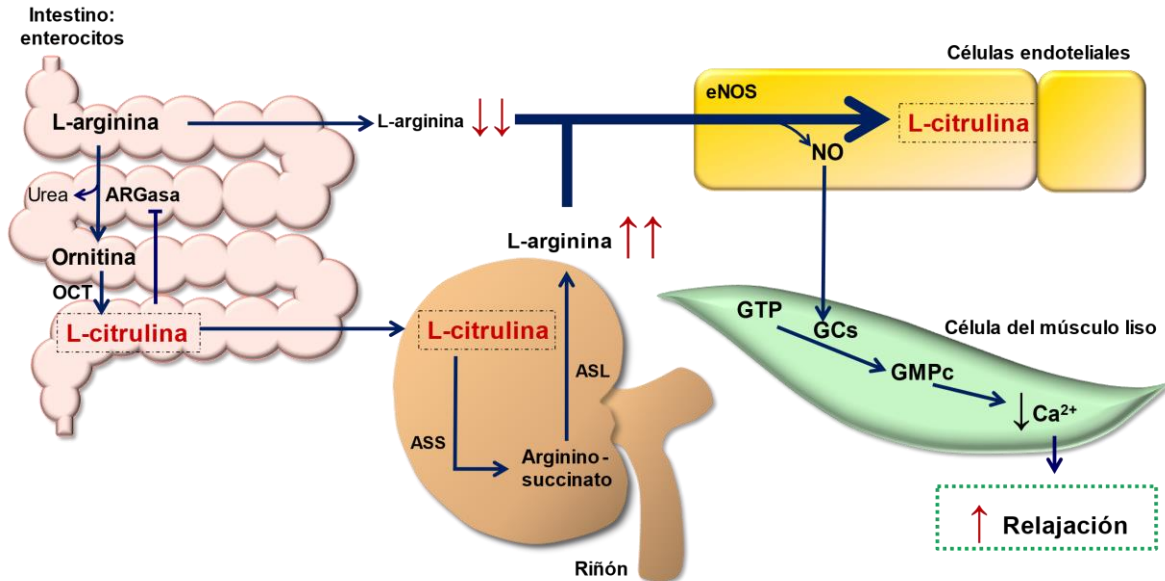
Diversos estudios han demostrado que, la L-citrulina es un suplemento orgánico oral seguro y un excelente precursor de la L-arginina y precursor indirecto del NO (Jeremy *et al.*, 1996; Papadia *et al.*, 2018; Szeffel *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021). Moinard y colaboradores (2008) en su estudio demuestran que la L-citrulina es bien tolerada, al no provocar efectos secundarios gastrointestinales en dosis altas (15 g). A diferencia de la L-arginina, que aun cuando es usada en dosis moderadas (10 g) presenta molestias gastrointestinales descritas previamente (Papadia *et al.*, 2017; Moinard *et al.*, 2008).

En un estudio clínico, se evaluó la administración intravenosa de la L-citrulina posterior a una cirugía cardíaca en niños. Los autores encontraron que la L-citrulina puede considerarse como una terapia alternativa para la hipertensión pulmonar postoperatoria, debido a que no se observaron efectos secundarios, encontrándose segura y bien tolerada (Barr *et al.*, 2015).

Del mismo modo, se ha demostrado que la L-citrulina resulta ser un mejor suplemento por vía oral con respecto a la L-arginina, debido a que presenta una mejor absorción y un incremento en los niveles plasmáticos y tisulares de L-arginina y en la biodisponibilidad de NO. Además, evita el metabolismo hepático de primer paso, ya que no es catabolizada por la enzima ARGasa, incluso es un inhibidor de esta, por lo que puede suprimir su actividad, lo que puede significar una estrategia para aliviar la disfunción endotelial (**Fig. 7**) (Allerton, 2018; Curis 2005; Figueroa 2017; Figueroa *et al.*, 2020; Gonzalez *et al.*, 2023).

La suplementación con L-citrulina podría ser un sustituto importante del suministro de L-arginina bajo condiciones patológicas que aumentan la actividad de la arginasa o limitan la disponibilidad de L-arginina (Romero *et al.*, 2006).

Siendo así, la L-citrulina es una alternativa viable para restaurar e incrementar la concentración de L-arginina y la biodisponibilidad del NO.



(Modificado de Figueroa, 2017)

Figura 7. Suplementación oral de L-arginina y L-citrulina. La L-arginina es catabolizada en los enterocitos por la ARGasa a urea y ornitina, reduciendo su biodisponibilidad en plasma. La enzima ARGasa no actúa sobre la L-citrulina, está tiene un efecto inhibitor (-) sobre la ARGasa. En el riñón, la L-citrulina se convierte en argininosuccinato por la ASS y está última en L-arginina (síntesis de novo) por acción de la ASL, incrementando la concentración de L-arginina circulante. La eNOS utiliza a la L-arginina como sustrato para producir L-citrulina y NO en las células endoteliales, el cual se difunde a las células del músculo liso vascular, estimulando a la (GCs) para la activación de GMPc, disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular, provocando la relajación del músculo liso. OCT: ornitina carbamoiltransferasa, ARGasa: arginasa, ASS: argininosuccinato sintasa, ASL: argininosuccinato liasa, eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial, NO: óxido nítrico, GTP: Guanosín trifosfato, GCs: guanilato ciclasa soluble, GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

Actualmente, existe un interés creciente por los efectos terapéuticos de la suplementación con L-citrulina en diferentes condiciones patológicas cardiovasculares, como la hipertensión, hipertensión pulmonar, angina y preclamsia. Además de que se ha reportado que su uso está relacionado con una restauración de la función endotelial en pacientes normotensos e hipertensos con angina microvascular (Papadia *et al.*, 2018; Rashid *et al.*, 2020).

Estudios clínicos y experimentales han enfatizado las principales acciones farmacológicas de la citrulina: antioxidante, participa en la vasodilatación, disminuye la migración de leucocitos, restaura el equilibrio de nitrógeno, participa en la síntesis de proteínas musculares, mejora la disfunción endotelial y preserva la respuesta mediadora antiinflamatoria (Kaore *et al.*, 2013).

A continuación, se mencionan algunas funciones fisiológicas y usos clínicos de la L-citrulina (**Cuadro 1**):

Cuadro 1. Funciones fisiológicas y uso médico potencial de la L-citrulina según experimentos con animales.	
Función fisiológica	Uso médico
Precursor de arginina	Compensa la deficiencia de arginina
Precursor de NO	Reduce la presión sanguínea en hipertensión Mejora la disfunción eréctil
Elimina radicales hidroxilo	Mejora la capacidad de redes neuronales en el envejecimiento

(Maric *et al.*, 2021)

En los primeros trabajos de investigación realizados con L-citrulina, tenían como objetivo incrementar los niveles de L-arginina, como un precursor del NO.

En un estudio experimental realizado por Urschel y colaboradores (2006) en cerdos recién nacidos, se les administró una dieta deficiente en arginina y suplementada con prolina, ornitina o citrulina, dichos autores demostraron que la

suplementación con L-citrulina (1.61 g/(kg·d)) aumentaba la concentración plasmática de L-arginina (Urschel *et al.*, 2006). Por lo que concluimos que la L-citrulina podría ser un recurso importante para la síntesis de NO.

La L-citrulina, como precursor del NO, ha sido investigada como un agente terapéutico para el tratamiento de patologías cardiovasculares, como la presión arterial elevada y la hipertensión pulmonar (Allerton *et al.*, 2018; Hotta *et al.*, 2014).

En un estudio clínico desarrollado en un grupo de personas en 2015 por Kim y colaboradores, reportaron que la ingesta oral de L-citrulina (3 g) estimula la síntesis *de novo* de L-arginina, tanto en el grupo de adultos mayores, como en el grupo de jóvenes. También evidenciaron que con la ingesta de L-citrulina, la síntesis deficiente de NO modificaba la disfunción vascular en adultos mayores con insuficiencia cardíaca. Asimismo, estos autores reportaron una mayor síntesis de NO en jóvenes que en adultos mayores con insuficiencia cardíaca (Kim *et al.*, 2015).

Figuroa *et al.*, (2012), demostraron que tanto la L-citrulina de grado farmacéutico como el consumo oral de extracto de sandía (6 g/d de L-citrulina) durante 6 semanas incrementaban los niveles renales de NO, contribuyendo de este modo a la prevención de la hipertensión y reduciendo la presión arterial en pacientes prehipertensos e hipertensos. En 2013 el mismo autor y colaboradores evidencian que haciendo uso de la misma dosis oral de L-citrulina (6 g/d) por el mismo lapso de tiempo, se presenta una rigidez arterial reducida en mujeres con obesidad posmenopáusicas (Figuroa *et al.*, 2012; Figuroa *et al.*, 2013).

En ratas con disfunción eréctil arteriogénica aguda, la suplementación oral durante 4 semanas con L-citrulina (2000 mg/d) demostró mejorar la función eréctil al incrementar la producción de NO (Hotta *et al.*, 2014).

En estudios experimentales realizados en ratas envejecidas, Ginguay y colaboradores han demostrado que el consumo oral de L-citrulina (1 g/kg·d) tiene un efecto neuroprotector en la potenciación a largo plazo (proceso de aumento duradero en la transmisión de señales entre neuronas), debido que al poseer propiedades antioxidantes evidencia ser un potente protector de lesiones oxidativas,

ya que, disminuye las ROS y marcadores del daño oxidativo, es un eliminador de radicales hidroxilos y protege al material genético, además de que se cree que pudiera ser un preventivo para limitar el deterioro cognitivo relacionado con la edad (Amane *et al.*, 2013; Ginguay *et al.*, 2019).

La evidencia mencionada previamente sugiere que, la suplementación oral con L-citrulina puede modular la actividad del MLV, debido al aumento de la biodisponibilidad del NO. Por tal motivo, en este trabajo propusimos que la suplementación oral con la L-citrulina podría incrementar la producción de NO y tener un efecto en la regulación de los mecanismos de contracción-relajación del MLV.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades cardiovasculares, como los trastornos relacionados con el corazón y los vasos sanguíneos y son la principal causa de fallecimiento en el mundo. Se estima que provocan alrededor de 17.9 millones de vidas cada año, lo que representa el 31% de todas las muertes registradas a nivel mundial (OMS, 2023).

En México, las enfermedades cardiovasculares son la segunda causa de muerte, siendo el 19% de mujeres y hombres entre 30 y 69 años. Además, se estima que el 70.3% de la población adulta vive, al menos con un factor de riesgo cardiovascular, ya sea hipertensión, dislipidemia, obesidad, sobrepeso, diabetes, tabaquismo, entre otros.

Actualmente, se ha incrementado el uso de la citrulina como un suplemento alimenticio, ya que se ha demostrado que tiene efectos antiinflamatorios, antioxidante y vasodilatador en el SC. Estudios experimentales y clínicos han mostrado que el consumo oral de la L-citrulina incrementa la concentración de L-arginina a nivel plasmático, la cual sirve como un sustrato para la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), y se incrementa la biosíntesis del óxido nítrico (NO) en las células endoteliales del músculo liso, lo que conlleva a su posible relajación.

Otros estudios han confirmado que el consumo oral de citrulina no presenta los efectos gastrointestinales secundarios producido por el consumo oral de la L-Arginina.

Debido a lo considerado previamente, nos planteamos la pregunta siguiente:

¿La administración oral crónica de citrulina modifica la respuesta de relajación de la aorta de ratas macho y hembra?

6. HIPÓTESIS

El tratamiento crónico de L-citrulina (3 meses), producirá un incremento en la relajación inducida por acetilcolina (ACh) en la aorta aislada de ratas adultas de 11 meses Sprague Dawley macho y hembra.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración oral crónica de citrulina (3 meses) en el mecanismo de relajación de la aorta aislada de ratas Sprague Dawley adultas macho y hembra.

7.2 Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto de la administración oral crónica (3 meses) de la L-citrulina en el mecanismo de relajación inducida por acetilcolina (ACh) en la aorta de ratas Sprague Dawley.
2. Determinar las posibles diferencias entre ratas Sprague Dawley macho y hembra por la administración oral crónica (3 meses) de la L-citrulina en el mecanismo de relajación de la aorta inducida por acetilcolina (ACh).

8. MATERIALES Y MÉTODO

8.1 Animales de estudio

Se usaron ratas macho y hembra de la cepa Sprague Dawley de 11 meses de edad, con un peso aproximado de 300 g en hembras y 500 g en machos. Los animales fueron reproducidos y criados en un ambiente controlado de luz/oscuridad (12 h-12 h) a una temperatura de $18 \pm 3^{\circ}\text{C}$, en cajas de acrílico con tapa con filtro en cama de aserrín estéril, con acceso a agua y alimento *ad libitum* en el bioterio de la Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. (Protocolo aprobado por el Comité de Ética en Investigación No. 36018 R-2022-3601-080)

El monitoreo y cuidado de la salud de los animales se llevó a cabo por personal capacitado del bioterio bajo las recomendaciones internacionales y en lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio*.

8.2 Compuestos químicos

Todos los compuestos químicos utilizados en el desarrollo de este trabajo fueron de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA), con excepción del malato de citrulina, donado por el laboratorio mexicano Pronat (Mérida, México) en cápsulas duras.

A continuación, se mencionan las concentraciones de los compuestos químicos utilizados durante el desarrollo experimental (**Cuadro 2**):

Cuadro 2. Compuestos químicos.		
Nombre	Concentración	Función
Acetilcolina (ACh)	0.01 μ M-100 μ M	Agonista colinérgico
Cloruro de potasio (KCl)	80 mM	Sal para inducir contracción en el MLV
Fenilefrina (Phe)	100 μ M	Agonista adrenérgico
Malato de citrulina	1.0 g/Kg	Suplemento alimenticio

8.3 Administración de citrulina

La disolución de citrulina se preparó el mismo día de la administración, disolviendo el polvo (malato de citrulina) contenido en las cápsulas duras (500 mg) en agua natural purificada (1 g malato de citrulina/ 3 mL H₂O)

A partir de la disolución preparada de citrulina y de acuerdo con el peso de cada rata, se les administró a los animales el volumen requerido para cumplir la dosis de citrulina diaria (1.0 g/Kg) vía esofágica, durante tres meses de lunes a viernes (Marquet-de Rougé *et al.*, 2013). Del mismo modo, los animales control recibieron la solución vehículo (agua natural purificada) durante el mismo periodo de tiempo.

La manipulación de los animales, para la administración de las soluciones vía esofágica, fue colocándolos decúbito supino, inmovilizando sus extremidades y cabeza, para garantizar que la cavidad oral y el cuello se encontrasen en un ángulo igual o mayor a 60°.

Para la administración de las soluciones vía esofágica, se utilizó una sonda reusable de acero inoxidable para alimentación de animales pequeños (Fisher Scientific, Massachusetts, USA) de 20 G con una longitud de 1.5" y diámetro de 2.25 mm, acoplada a la jeringa. Las soluciones de L-citrulina o agua fueron administradas lentamente y con cuidado al presionar el émbolo de la jeringa para evitar la entrada de aire al estómago del animal.

Se utilizaron un total de 24 ratas Sprague Dawley, las cuales se dividieron en cuatro grupos experimentales. En el siguiente cuadro se describen los grupos (**Cuadro 3**)

Cuadro 3. Descripción de grupos experimentales.	
Grupo 1 (n = 6)	Ratas macho con vehículo (control)
Grupo 2 (n = 6)	Ratas macho suplementadas con malato de citrulina (1 g/Kg)
Grupo 3 (n = 6)	Ratas hembra con vehículo (control)
Grupo 4 (n = 6)	Ratas hembra suplementadas con malato de citrulina (1 g/Kg)

8.4 Sistema de órganos aislados *in vitro*

Los estudios experimentales se realizaron en un sistema de órganos aislados *in vitro* para evaluar el mecanismo de relajación de la aorta inducida por la ACh en ratas expuestas a una administración oral crónica de citrulina (1 g/Kg).

Los 24 animales utilizados fueron anestesiados con pentobarbital sódico (PiSA® Agropecuaria, Guadalajara, México) (35 mg/Kg) vía intraperitoneal. El bloque cardiopulmonar fue removido y se retiró la aorta de manera cuidadosa evitando dañarla, separando el tejido conectivo. De cada aorta, se adquirieron cuatro anillos de 3-4 mm de longitud, aproximadamente.

Cada anillo aórtico se colocó en una cámara de órganos aislados, que contenía 5 mL de solución Ringer-Krebs-Bicarbonato (RKB), con la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.77, KH₂PO₂ 1.2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11, mantenido a 37 °C, con burbujeo constante de una mezcla 5% CO₂ y 95% O₂, a 37°C y un pH de 7.4. Y cada anillo fue ajustado entre dos ganchos metálicos, uno de los ganchos se encontraba conectado a un transductor de tensión (BIOPAC Systems Inc., CA., DA 100C) para registrar la tensión isométrica. Las señales de los transductores fueron digitalizadas con una interfase (BIOPAC

Systems Inc., CA., MP150) y los cambios en la tensión fueron monitoreados con un software (BIOPAC Systems, AcqKnowledge 3.9.1).

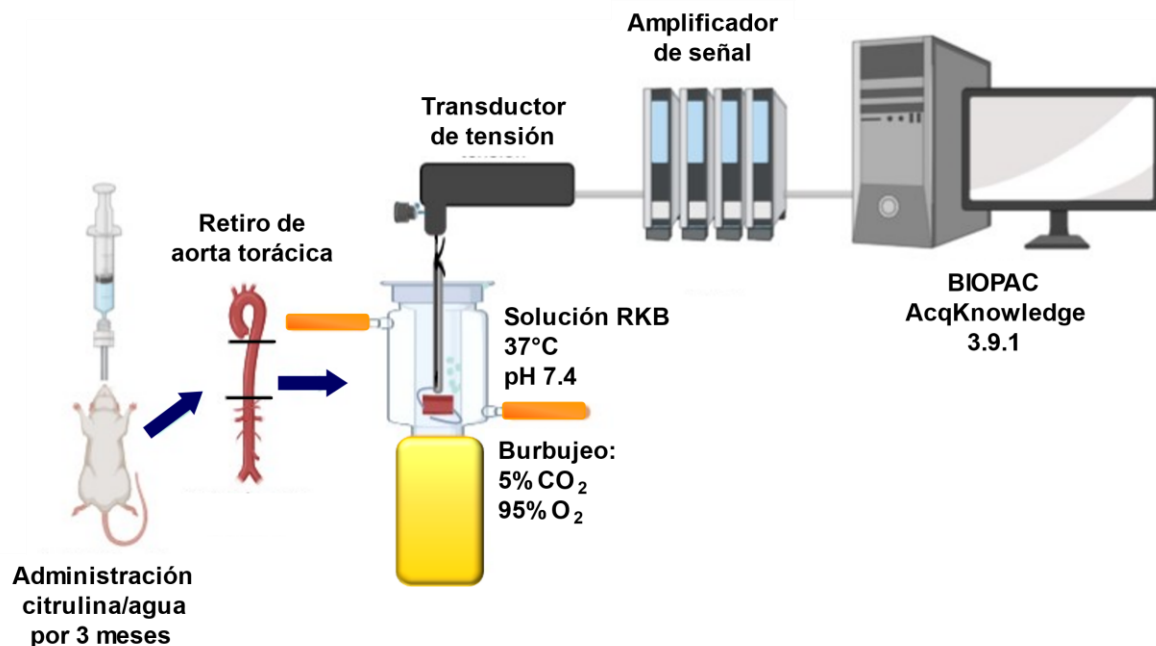


Figura 8. Esquema de sistema de órganos aislados *in vitro* empleado para evaluar la relajación de la aorta de ratas.

De manera inicial, los tejidos se mantuvieron a una tensión de 1.5 g por un periodo de 30 minutos, realizando cambios de solución RKB cada 15 min para estabilizarlos. Posteriormente, cada anillo de aorta fue estimulado con 80 mM de KCl con el fin de corroborar la viabilidad del tejido. Después de cada estímulo con 80 mM de KCl, se lavó con la solución RKB y durante 30 min se dejó estabilizar. Este proceso se repitió tres veces. La tercera respuesta de 80 mM de KCl fue considerada como el 100% de respuesta de contracción de la aorta.

Posteriormente, el tejido se estimuló con Phe (100 μ M). A esta respuesta de contracción, se adicionó acetilcolina (ACh) para evaluar el mecanismo de relajación y el cual fue evaluado de dos maneras diferentes (**Fig. 9**):

Concentración única de ACh (100 μM) durante por 26 min (**Fig. 9A**).

Curva acumulativa de ACh (0.01 μM -100 μM). Se añadieron concentraciones crecientes de ACh al anillo de la (0.01, 1, 10 y 100 μM) (**Fig. 9B**).

La respuesta de relajación inducida por ACh fue analizada como porcentaje de inhibición de la respuesta máxima de contracción de Phe (100 μM) considerada esta respuesta como el 100% de la contracción. Así mismo, se evaluó la respuesta de relajación acumulativa de ACh (0.01 μM -100 μM). En la evaluación de la concentración única (100 μM) de ACh, se midió cada 2 min por un periodo de 26 min.

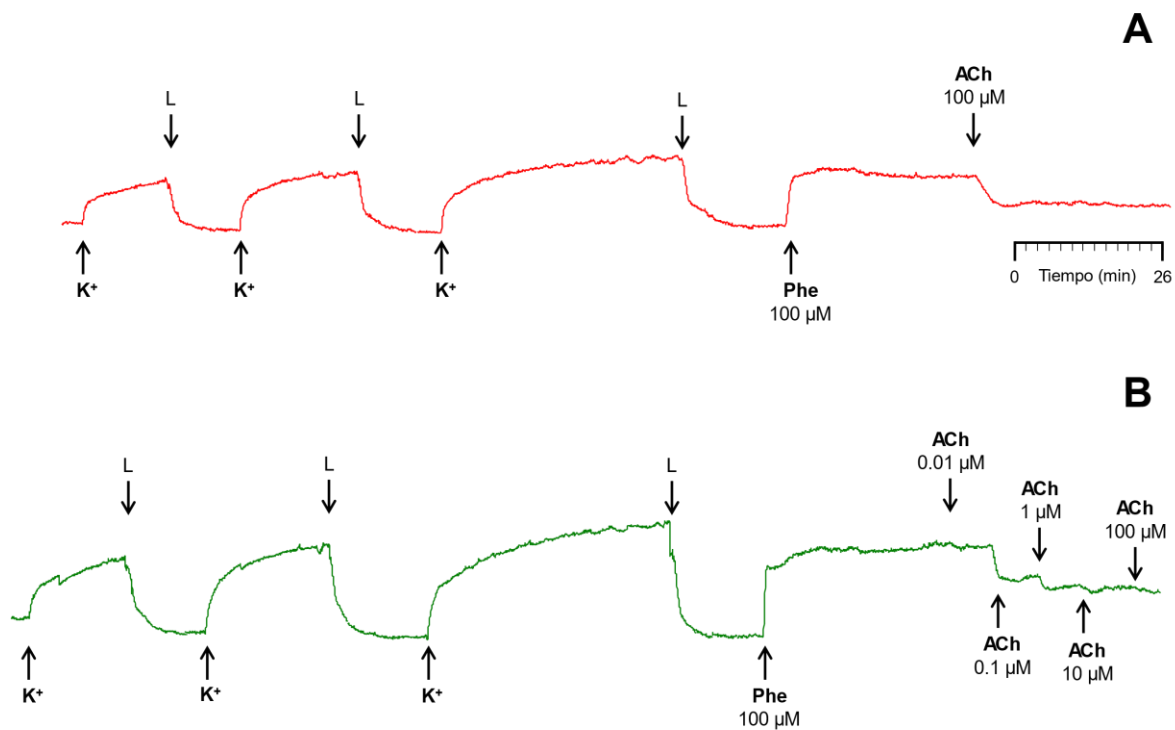


Figura 9. Registro representativo de sistema de órganos aislados in vitro. A. Relajación de aorta inducida por una concentración única de ACh (100 μM). **B.** Relajación de aorta inducida por concentraciones acumulativas de ACh (0.01 μM -100 μM). K^+ (80 Mm); L: Lavados con solución RKB; Phe: fenilefrina; ACh: Acetilcolina.

Los resultados fueron evaluados también como el área bajo la curva expresada como unidades arbitrarias cuadradas (ua^2) haciendo uso del método de integración trapezoidal.

8.5 Análisis estadístico

Los datos se expresan como el valor de la media \pm EE (error estándar). Los grupos experimentales tuvieron una $n=5-6$. Las diferencias estadísticas entre cada punto fueron determinadas por medio de una prueba de t de Student para datos pareados. Mientras que, las diferencias estadísticas entre más de dos grupos fueron determinadas con el uso de la prueba estadística ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey *post hoc*. La diferencia estadística se estableció a un nivel de $p<0.05$ de dos colas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software INERSTAT v2.0, desarrollado por el Dr. Mario Vargas y en GraphPad Prism 8.0.

9. RESULTADOS

En este trabajo, evaluamos el efecto de la administración oral de L-citrulina (1 mg/Kg) de forma crónica (3 meses) en el mecanismo de relajación de la aorta de ratas macho y hembras adultas Sprague Dawley.

En la **Figura 10A**, se observa la respuesta de relajación inducida por ACh (100 μ M) en aorta de ratas macho no tratadas y tratadas con L-citrulina. Se muestra que la ACh produce una relajación inicial rápida y esta relajación se mantiene a lo largo del tiempo evaluado (26 min). La máxima relajación obtenida de los animales no tratados fue $41.8 \pm 5.1\%$, mientras que los animales tratados con citrulina fue $41.8 \pm 4.5\%$. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Asimismo, se obtuvo el área bajo la curva, expresada como unidades arbitrarias al cuadro (ua^2) de estas curvas. De igual forma, no se encontraron diferencias significativas ($854.3 \pm 43.5 ua^2$ y $975.4 \pm 47.0 ua^2$, respectivamente) (**Fig. 10B**).

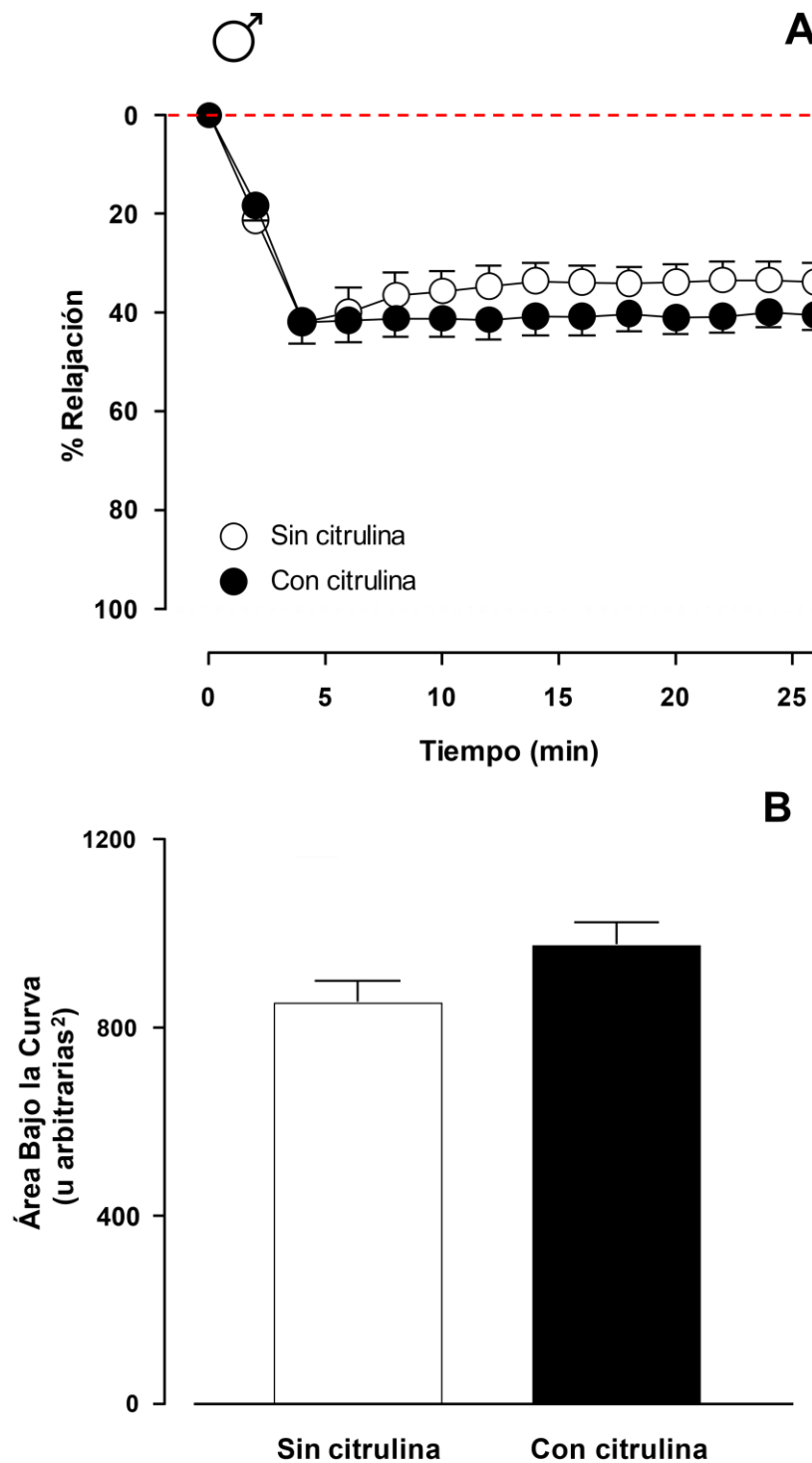


Figura 10. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por acetilcolina (ACh, 100 μ M) en anillos aislados de aorta de ratas macho Sprague Dawley. **A.** Relajación inducida por ACh a los 26 min. **B.** Área bajo la curva (ua^2). Los datos representan el promedio \pm E.E. ($n=6$)

En la figura **11A**, se aprecia la respuesta de relajación inducida por la ACh (100 μ M) en la aorta de ratas hembras no tratadas y tratadas con L-citrulina . En la figura **11A** se observa en los primeros 2 minutos una relajación rápida, donde el grupo tratado con L-citrulina alcanza una relajación máxima del $55.1 \pm 4.0\%$ y el grupo control de $42.4 \pm 4.3\%$, sin mostrar diferencias significativas.

En los minutos subsecuentes, el grupo tratado con citrulina mantiene la relajación inducida por la ACh a lo largo del tiempo. No así con el grupo control. Estas respuestas muestran diferencias significativas a partir del minuto 6.

Al evaluar el área bajo la curva de la respuesta de relajación (**Fig. 11B**), encontramos que los animales no tratados presentan un área bajo la curva de $881.8 \pm 50.3 \text{ ua}^2$ y $1305.0 \pm 50.4 \text{ ua}^2$ en los tratados con L-citrulina, mostrando diferencia significativas (** $p < 0.001$).

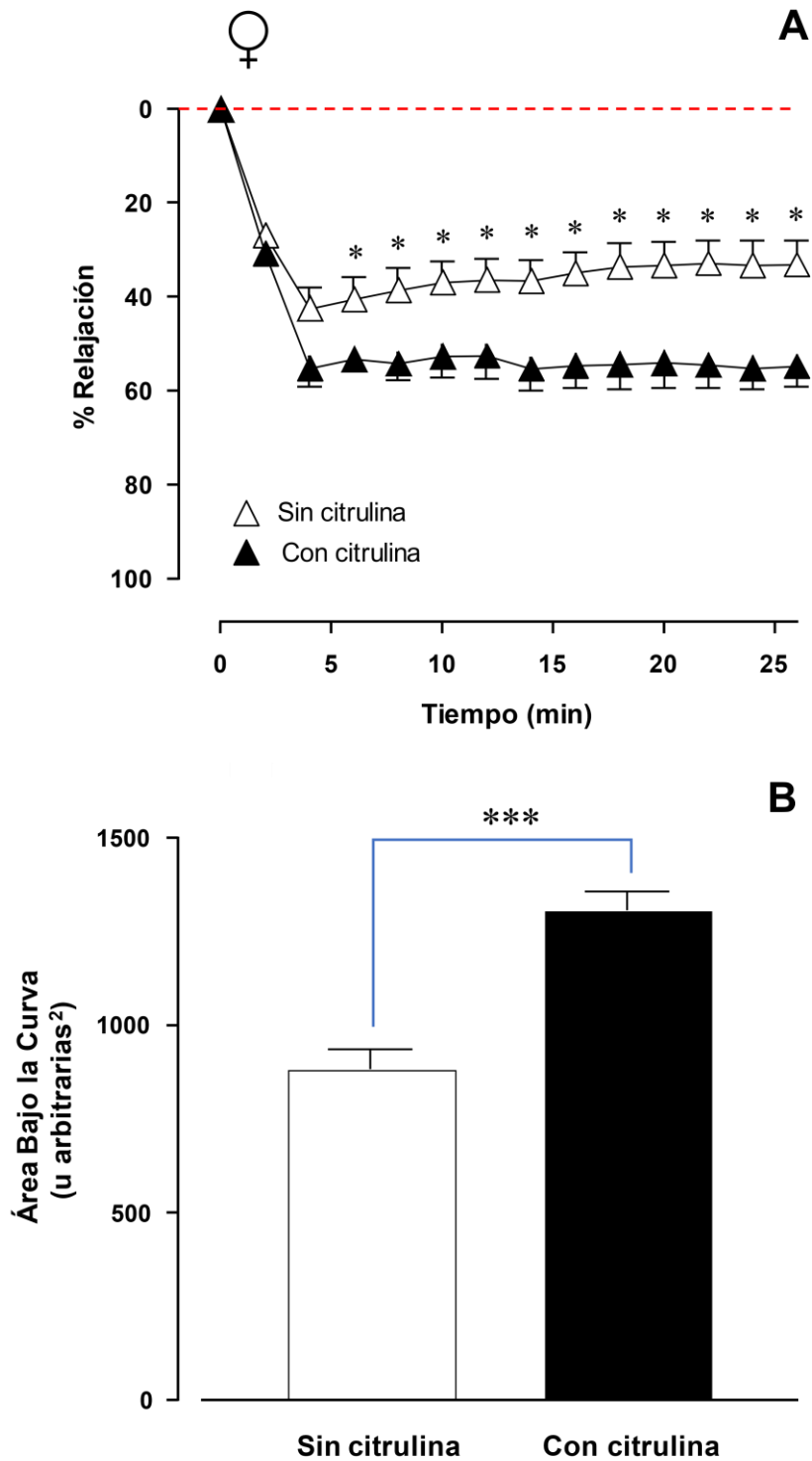


Figura 11. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh $100 \mu\text{M}$ en anillos aislados de aorta de ratas hembra Sprague Dawley. **A.** Relajación inducida por ACh a los 26 min. **B.** Área bajo la curva (u^2). Los datos representan el promedio \pm E.E. ($n=5$). * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

En la **Figura 12**, se observa una comparación entre las hembras y machos tratados y no tratados, para evaluar la posible diferencia de la respuesta relacionada con el sexo. La comparación de la respuesta de relajación inducida por la ACh, tanto en hembras como en machos no tratados, no presentó diferencias significativas (**Fig. 12A**). Es decir que, esta respuesta no depende del sexo.

No obstante, es importante destacar que el tratamiento con L-citrulina produce una mayor relajación inducida por ACh en la aorta de las hembras comparado con los machos, alcanzando diferencias significativas a partir del minuto 14 (**Fig. 12A**). La máxima respuesta de relajación por ACh en la aorta de las hembras tratadas fue de $55.14 \pm 4.8\%$, mientras que en la aorta de los machos tratados la máxima alcanzada fue de $41.8 \pm 4.5\%$.

Al evaluar el área bajo la curva de estos datos, observamos diferencias significativas entre las hembras tratadas (1305.0 ± 50.4) y los machos tratados con citrulina (975.4 ± 47.0) (**Fig. 12B**).

Previamente, mencionamos las diferencias significativas que existen entre las hembras tratadas y no tratadas (**Fig. 11**).

Cuadro 4. Efecto del tratamiento crónico de L-citrulina en la relajación de aorta de rata inducida por ACh (100 μM) durante 26 minutos. Área bajo la curva, expresados como ua^2 (ABC \pm EE)				
	Machos tratados	Machos control	Hembras tratadas	Hembras control
ABC\pmEE	975.4 \pm 47.0	854.3 \pm 43.5	1305.0 \pm 50.4	881.8 \pm 50.3

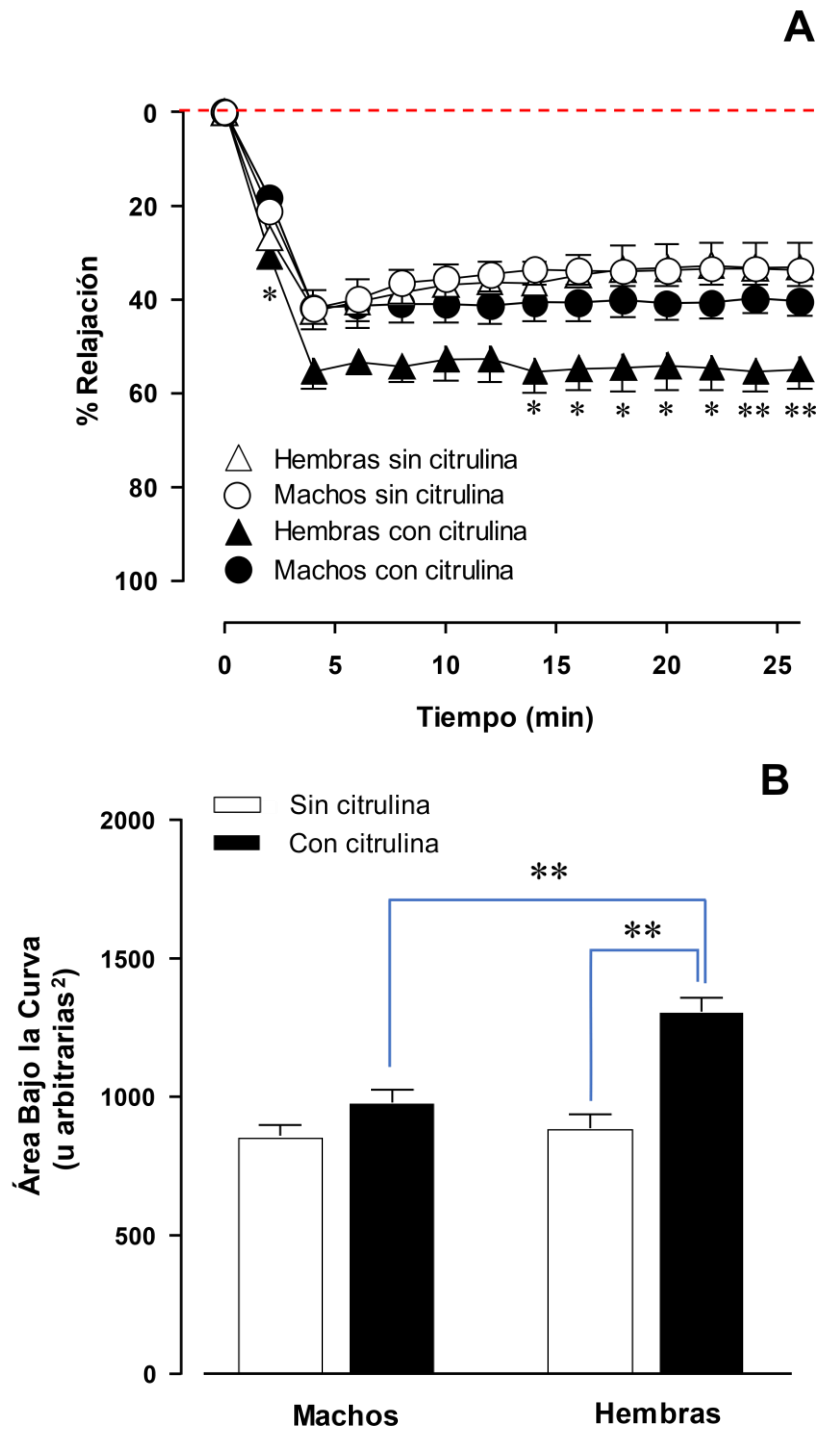


Figura 12. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh $100 \mu\text{M}$ en anillos aislados de aorta de ratas macho y hembra Sprague Dawley. **A.** Relajación inducida por ACh a los 26 min. **B.** Área bajo la curva (ua^2). Los datos representan el promedio \pm E.E., ($n=6$) ($n=5$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Además, se evaluó el efecto de la L-citrulina en la relajación inducida por ACh utilizando concentraciones acumulativas (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M). Se realizó una prueba t de student para comparar la respuesta entre ambos grupos (tratados y control) a las diferentes concentraciones, En la figura **13A**, observamos que no se observan diferencias significativas entre la relajación inducida por la ACh en la aorta de ratas machos tratados con L-citrulina y el grupo control. Se observa una ligera tendencia de mayor relajación en los animales tratados con L-citrulina, alcanzando una respuesta máxima de relajación ($53.1 \pm 1.9\%$) a una concentración de 100 mM de ACh (**Fig. 13A**).

Al evaluar el área bajo la curva de estos datos, no se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de machos tratados (149.5 ± 7.0) y no tratados (132.6 ± 9.1) (**Fig. 13B**).

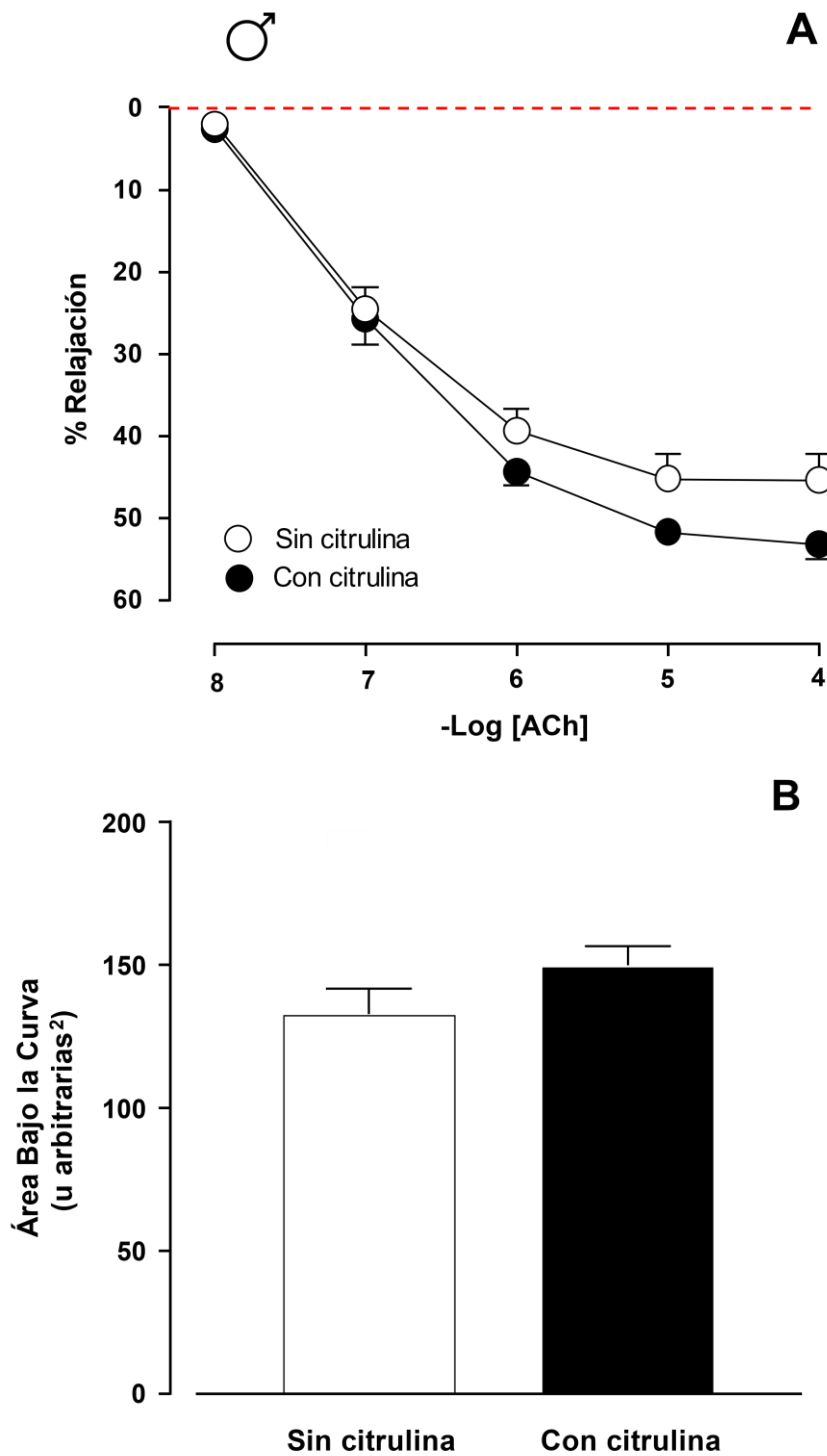


Figura 13. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh ($0.01 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$) en anillos aislados de aorta de ratas macho Sprague Dawley. **A.** Relajación dependiente de la concentración de ACh. **B.** Área bajo la curva (u^2). Los datos representan el promedio \pm E.E. ($n=6$).

En la figura **14A**, se realizó el mismo procedimiento estadístico llevado a cabo con los grupos de ratas macho. Se observa la curva de relajación acumulativa de aorta de ratas hembra tratadas y no tratadas con L-citrulina inducida por ACh (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M). No se muestran diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se aprecia una mayor relajación en el grupo tratado, con un valor de $62.8 \pm 4.4\%$ con respecto al no tratado $52.8 \pm 3.4\%$.

La expresión del área bajo la curva (ua^2) de estos datos no muestran diferencias significativas, donde el grupo tratado presenta un valor de 188.6 ± 12.0 y el grupo no tratado 159.1 ± 13.0 .

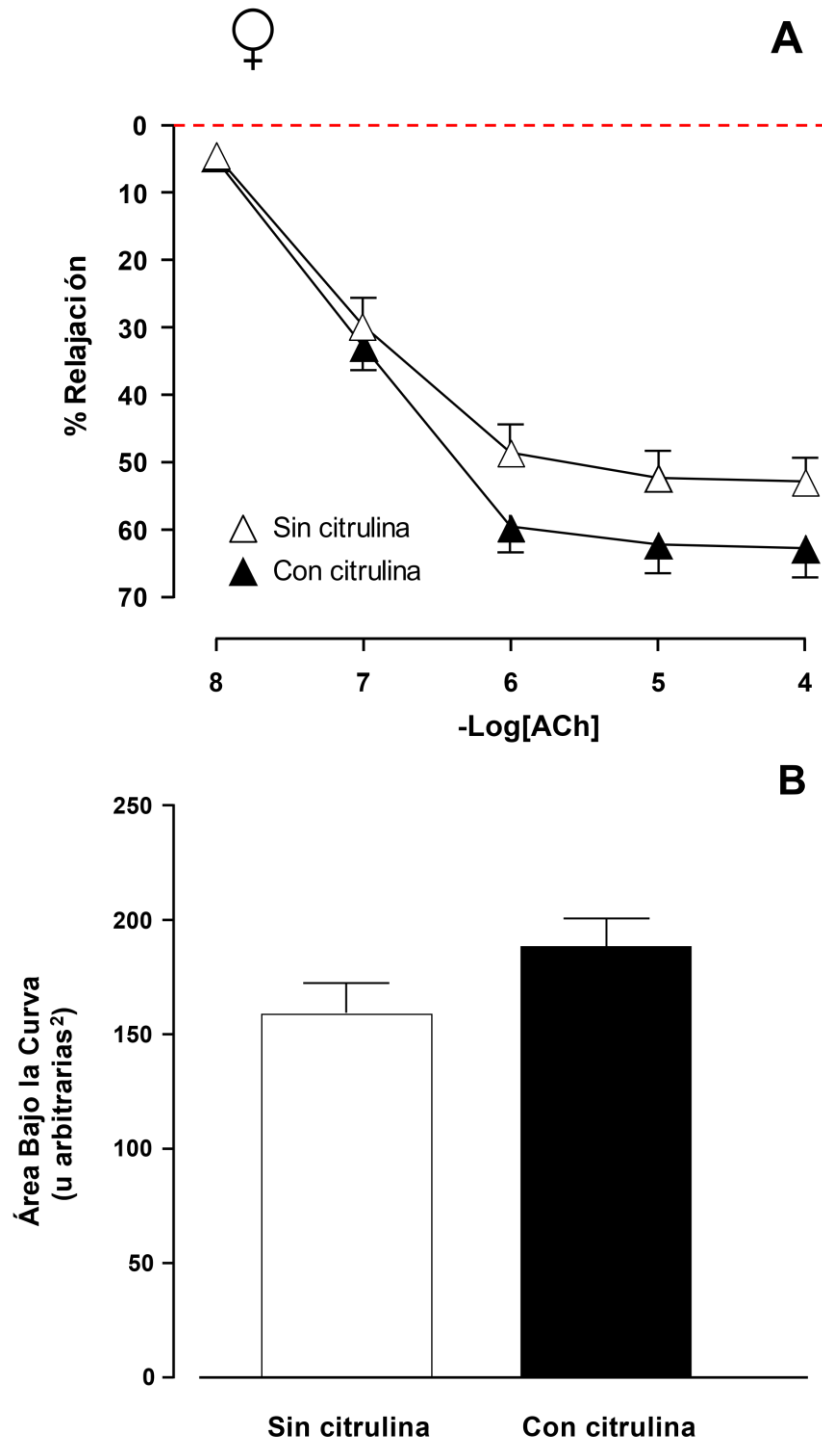


Figura 14. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh ($0.01 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$) en anillos aislados de aorta de ratas hembra Sprague Dawley. **A.** Relajación dependiente de la concentración de ACh. **B.** Área bajo la curva (u^2). Los datos representan el promedio \pm E.E. ($n=6$).

Con la finalidad de comparar y conocer una posible diferencia en la respuestas de relajación entre hembras y machos tratados y no tratados en la respuesta de relajación de ACh acumulativa se conjuntaron las gráficas (**Fig. 15**).

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, en la **Fig. 15A** únicamente se observan diferencias significativas entre los grupos de hembras y machos tratados con L-citrulina a la concentración de 1 μM de ACh. Se aprecia que la respuesta de relajación en el grupo de hembras tratadas con L-citrulina a esta concentración es de $59.6 \pm 3.7\%$ y la de machos tratados de $44.2 \pm 1.7\%$.

Al evaluar el área bajo de estas curvas, no se encuentran diferencias significativas (**Fig. 15B**).

Cuadro 5. Efecto del tratamiento crónico de L-citrulina en la relajación de aorta de ratas inducida por ACh (0.01 μM -100 μM). Área bajo la curva (ABC \pm EE) expresados como ua^2

	Machos tratados	Machos control	Hembras tratadas	Hembras control
ABC\pmEE	149.5 \pm 7.0	132.6 \pm 9.1	188.6 \pm 12.0	159.1 \pm 13.0

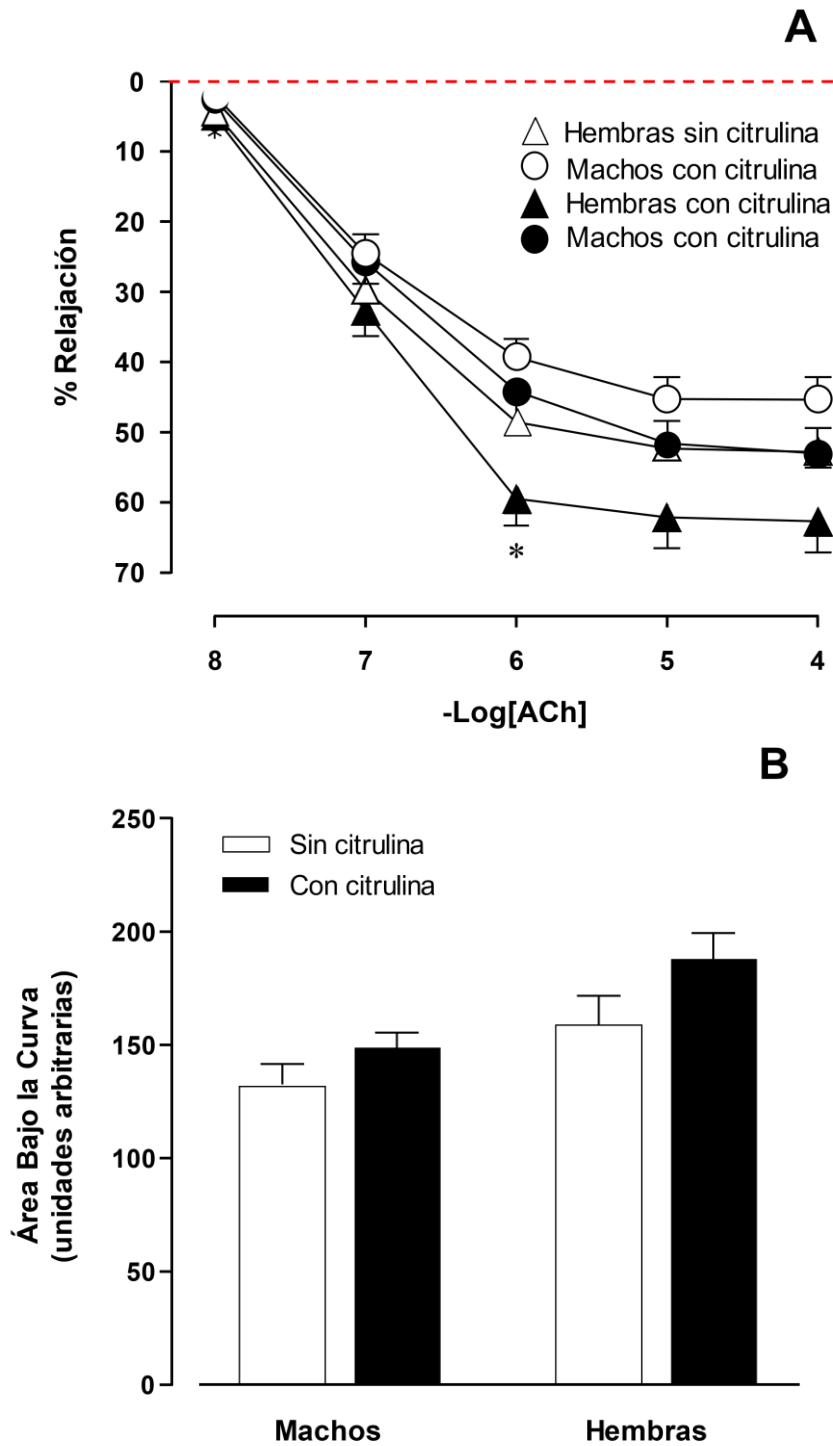


Figura 15. Efecto de la L-citrulina en la respuesta de relajación inducida por ACh ($0.01 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$) en anillos aislados de aorta de ratas macho y hembra Sprague Dawley. **A.** Relajación dependiente de la concentración de ACh. **B.** Área bajo la curva (ar^2). Los datos representan el promedio \pm E.E. ($n=6$) * $p<0.05$

10. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la relajación inducida por ACh en aortas de ratas macho y hembra tratadas con L-citrulina (1 mg/Kg) durante 3 meses.

De manera importante, los resultados de este trabajo de investigación destacan un incremento de la relajación inducida por ACh en la aorta de ratas aislada de hembras tratadas con L-citrulina, comparado con las no tratadas. Otro resultado trascendente fue que se produjo una mayor relajación en la aorta de ratas hembra comparada con la aorta de machos, ambos tratados con L-citrulina.

Con los resultados obtenidos, confirmamos lo que ha sido reportado previamente, donde la Phe produce una contracción sostenida de la aorta. Al adicionar ACh se produce una relajación, tanto en una curva acumulativa como en dosis únicas.

Podemos destacar en este trabajo que existe una visible tendencia a una mayor relajación de la aorta por ACh en los animales tratados con citrulina, aunque sin diferencias significativas. Es posible que, al incrementar el tamaño de la muestra, o bien, la dosis utilizada de L-citrulina, se pudiesen encontrar diferencias significativas entre el grupo tratado y el control, observando de manera evidente los efectos en la relajación de la L-citrulina.

En nuestros resultados observamos que la aorta estimulada con Phe, induce una contracción inicial sostenida. Y al adicionar posteriormente ACh provoca una rápida relajación. La liberación de la ACh de las terminaciones nerviosas induce la liberación del NO por las células endoteliales, y la consecuente relajación de los vasos sanguíneos (Waldman & Murad, 1988). La ACh provoca la hiperpolarización dependiente del endotelio al activar los subtipos de receptores M₃ muscarínicos, para la activación del GCs, mecanismo descrito con anterioridad (Vanhoutte *et al.*, 2016).

Como hemos descrito, diversos estudios han mostrado que el consumo de la L-citrulina estimula la producción de NO (González & Trexler, 2020; Papadia *et al.*, 2018; Curis *et al.*, 2005). La L-citrulina se convierte en L-arginina mediante las enzimas ASS y ASL para ser utilizada por las células endoteliales de los vasos sanguíneos y con la consiguiente síntesis de NO. El NO activa la GCs en las células del MLV, con la producción respectiva del GMPc iniciando la relajación. Dando como resultado que la L-citrulina incrementa la capacidad vasodilatadora del endotelio vascular (Moinard *et al.*, 2008; Caballero-García *et al.*, 2021). Como mencionamos previamente, la activación de la AC por la proteína G_s incrementa al AMPc, el cual regula la actividad del MLV produciendo relajación. Mientras que la acción de la proteína G_i , inhibe la actividad de la AC.

En este trabajo, no evaluamos directamente la expresión de la producción de NO en la aorta, sin embargo, a partir de la información conocida acerca del papel que desempeña la L-citrulina en la producción del NO, el cual induce relajación en el MLV, consideramos que la relajación observada en los animales tratados fue debido a la producción del NO.

Bassil y Anand-Srivastava (2006) proporcionan evidencia de que el NO provocó una disminución en la expresión de proteínas $G_{i\alpha}$ y las funciones asociadas en las células del MLV de la aorta independiente del GMPc, lo cual puede ser otro mecanismo importante para los efectos fisiológicos vasodilatadores (Aronsson *et al.*, 2023; Bassil & Anand-Srivastava, 2007).

Además del NO, existen otros mecanismos que pueden estar participando en el proceso de la relajación, por la acción de otros compuestos químicos que inhiben la contracción; por ejemplo, la prostaciclina (PGI₂) o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) que debido a la reducción de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se produce la relajación. Por su parte, los canales de K^+ del MLV regulan el flujo del K^+ , en una hiperpolarización de la membrana, donde se produce un cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que provoca la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, que conduce a la relajación de las células del MLV (Nelson & Quayle, 1995).

En general, podemos decir que la relajación se presenta por la eliminación de cualquier estímulo de contracción (Brozovich *et al.*, 2016).

Es importante también considerar la participación del endotelio en la regulación de la homeostasis vascular en la aorta. En casos donde el endotelio esté ausente o sea disfuncional, no se presenta la relajación de los vasos sanguíneos, debido principalmente a la agregación plaquetaria, la activación de varios vasoconstrictores, como el tromboxano A2 (TXA2) o serotonina (5-HT). Descrito lo anterior, otro factor importante a considerar es la edad de las ratas. Las ratas utilizadas en este trabajo tuvieron una edad inicial de 8 meses y al terminar 11-12 meses de edad, considerándose en el final de su edad reproductiva y cercanas al envejecimiento. Estudios en modelos animales han demostrado que existe una importante asociación entre la disfunción endotelial y el envejecimiento (Koga *et al.*, 1989). Koga *et al.*, (1989) reportaron la relajación de la aorta con la estimulación de la ACh, comparando ratas jóvenes (4-6 semanas), adultas (3-6 meses) y viejas (12-25 meses). En su estudio estos autores informan una mayor relajación de la aorta por ACh en las ratas jóvenes comparado con ratas adultas y viejas. Mientras que, la relajación es menor en las ratas viejas (Koga *et al.*, 1989).

El envejecimiento es un factor que influye en la fisiología de los vasos sanguíneos, contribuyendo a la disfunción cardiovascular al haber cambios estructurales y funcionales vasculares. La senescencia de la EC es un proceso fisiopatológico de estructura y cambios fisiológicos, como la desregulación del tono vascular, el aumento de la permeabilidad del endotelio, un aumento en la rigidez, deterioro en la reparación vascular, lo que conduce al progreso y avance de ECV. (Jia *et al.*, 2019).

Se ha observado que el proceso de envejecimiento conlleva también la producción de radicales libres y ROS, que inducen la degradación del NO, reduciendo su biodisponibilidad, lo que provoca un deterioro de la función vascular, en sujetos normotensos y pacientes hipertensos (Viridis, 2012).

Por otra parte, en nuestro estudio encontramos diferencias en el efecto de la suplementación con L-citrulina con respecto al sexo. Existen una amplia variedad

de factores asociados a las diferencias entre los sexos, como aspectos genéticos, fisiológicos, morfológicos, entre otros. Por ejemplo, estudios han encontrado que existe una disimilitud en la carga parasitaria entre hombres y mujeres, por lo que puede haber diferencias en la capacidad de la respuesta inmune, además de que las hormonas sexuales pueden afectar también dichas respuestas (Roved *et al.*, 2017). Otro ejemplo, es la diferencia en el rendimiento neuromuscular dada por la diferencia fisiológica, algunos músculos en los hombres poseen una mayor área de fibras musculares que son más rápidas metabólicamente y funcionalmente debido a diferencias relacionadas con la expresión de genes del músculo esquelético humano y a las interacciones con hormonas específicas del sexo (Hunter, 2014). Diversos autores han descrito la asociación entre las enfermedades cardiovasculares con respecto al sexo. Estudios clínicos y epidemiológicos han comprobado diferencias en la aparición y progresión de la hipertensión, siendo más prevalente en hombres; sin embargo, en la posmenopausia las mujeres padecen elevaciones más rápidas de la presión arterial (Boese *et al.*, 2017).

De la misma forma, la vasoconstricción se ve modificada con respecto al sexo. Se ha reportado que, en las mujeres la amplitud de la vasoconstricción es menor respecto a los hombres, diferencia inducida por los receptores adrenérgicos alfa (Hinojosa-Laborde *et al.*, 1999). No obstante, en la carótida aislada de ratones hembra viejas presenta mayor vasoconstricción mediada por la señalización adrenérgica α_{1A} por el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de prostanoïdes derivados de la ciclooxigenasa (Costa *et al.*, 2023).

Las hormonas sexuales tienen un rol importante sobre la función de las células endoteliales, es bien sabido que la proporción de esteroides, como el estrógeno y la testosterona entre hombres y mujeres es diferente, estudios clínicos han determinado que, las mujeres tienen un riesgo menor de desarrollar ECV durante sus años fértiles en comparación con los hombres, destacando el papel protector de los estrógenos, no obstante, a lo largo del ciclo de vida varían las concentraciones de los esteroides sexuales, por lo que cuando las mujeres llegan a la menopausia presentan un mayor riesgo de ECV, por lo que esta protección se

pierde debido a que los niveles de estrógeno disminuyen (Sullivan & Fowlkes, 1996; White, 2002; Viridis, 2012; Vanhoutte, 2016; Shufelt *et al.*, 2018).

Datos experimentales reportan que las hormonas sexuales también pueden alterar la sensibilidad de los vasos sanguíneos a diferentes agonistas después de un tratamiento dado (Kauser & Rubanyi, 1995). Un estudio realizado por Rubanyi y colaboradores en 1997 informó que la infusión de dosis supra fisiológicas de estrógeno mejoró la función endotelial de mujeres posmenopáusicas, sin embargo, el efecto del estrógeno sobre la relajación dependiente del endotelio fue suprimido por un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico, NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), lo cual demuestra que el efecto positivo del estrógeno sobre la relajación dependiente del endotelio está relacionado con la restauración de la biodisponibilidad del NO (Rubanyi *et al.*, 1997)

Diferentes estudios e investigaciones han propuesto que los estrógenos tienen un rol en la relajación del sistema cardiovascular (SC) en respuesta a diversas sustancias endógenas en las mujeres y los andrógenos en los hombres pueden contribuir a un aumento en la presión arterial con mecanismos relacionados a la disminución de la biodisponibilidad de NO que involucra también a ROS. Evidencias han demostrado que los estrógenos mejoran la relajación inducida por la ACh en arterias uterinas y femorales de cobayos y conejos, respectivamente (Cheng *et al.*, 1994; Stanhewicz *et al.*, 2010).

Por su parte, se sabe que la unión de los estrógenos a la eNOS activada promueve una producción de NO en la caveola de las células endoteliales y por consecuencia hay relajación vascular y vasodilatación dependiente del endotelio. Además, el estradiol puede incrementar la sensibilidad a factores vasodilatadores como la ACh o las prostaglandinas y por consecuencia, disminuye la concentración requerida para tener respuestas vasodilatadoras, asimismo el estradiol atenúa la entrada y/o estimula la salida de Ca^{2+} en VSMC (Vanhoutte., *et al* 2016).

Los estudios han demostrado que las respuestas de relajación son más pronunciadas en arterias de hembras premenopáusicas, que de machos. En un estudio en cerdos, la función del endotelio vascular coronario demostró mayor

respuesta de relajación y sensibilidad a los agonistas dependientes del endotelio en arterias coronarias aisladas de hembras sanas en comparación con los cerdos macho. Además de que se ha observado en estudios una liberación elevada de NO en arterias coronarias femeninas con respecto a las masculinas, vasodilatador que como se mencionó previamente, consideramos fue el causante por el cual se presentó una mayor relajación en los grupos tratados con L-citrulina (Barber & Miller, 1997; Levy., *et al* 2009; Vanhoutte., *et al* 2016).

Lo anterior escrito puede explicar porqué el grupo de hembras tratadas con L-citrulina presentó una mayor relajación dependiente del endotelio con respecto al grupo de machos. Sin embargo, debido a que hay pocos estudios e información sobre el uso de la L-citrulina y sus posibles diferencias en la respuesta en hembras y machos, este trabajo puede ser un precedente para nuevos estudios, donde se compare la respuesta de este suplemento.

11. CONCLUSIONES

1. La administración crónica de L-citrulina incrementó la respuesta de relajación inducida por Acetilcolina (ACh) en la aorta de ratas hembra adultas tratadas.
2. La administración oral crónica de L-citrulina en machos no modifica la relajación por ACh de la aorta comparada con el grupo control.
3. El consumo crónico de la L-citrulina produjo una mayor relajación de la aorta por ACh del grupo de las hembras en comparación con el grupo de los machos.

12. PERSPECTIVAS

En futuras investigaciones, una propuesta importante sería evaluar si se modifica la síntesis del NO por la administración crónica de la L-citrulina. Para ello, se podría determinar farmacológicamente en el sistema de órganos aislados *in vitro*, utilizando algún inhibidor de la NOS, como el éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME) ó el N-nitro-L-arginina (L-NOARG). Del mismo modo, podríamos evaluar la expresión de la enzima NOS con el uso de técnicas biomoleculares de Western Blot o qPCR (quantitive Real Time-Polymerasa Chain Reaction, por sus siglas en inglés), o por la expresión de NOS, a través de la técnica de Inmunohistoquímica.

Existe un estereotipo en la investigación biomédica por utilizar de manera exclusiva a los machos en los modelos experimentales. Esto ha provocado un sesgo en la investigación, al dejar de evaluar los posibles efectos en las hembras. Por este motivo, no existen suficientes estudios experimentales que nos brinden información sobre las posibles diferencias de los procesos de contracción y relajación del MLV entre hembras y machos. Con este trabajo, se muestra la importancia de la evaluación entre el sexo masculino y femenino.

Además, es importante considerar en estudios posteriores, evaluar las posibles diferencias que existen en cada etapa del ciclo estral de la rata.

Otro factor muy importante, que pudiéramos considerar es evaluar a diferentes edades de animales, ya sea jóvenes, adultos y viejos para evaluar si la respuesta al consumo de la L-citrulina modifica la respuesta del MLV.

Finalmente, con la realización de este trabajo, hemos contribuido y participado con información sobre la L-citrulina y su efecto en la respuesta de relajación tanto en hembras como en machos.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson, P., Ward, J., & Connolly, M. (2020). *The cardiovascular system at a glance: Anatomy and histology* (Fifth ed.). London: Wiley-Blackwell.
- Afewerki, T., Ahmed, S., & Warren, D. (2019). Emerging regulators of vascular smooth muscle cell migration. *J Muscle Res Cell Motil*, 40(2), 185-196. doi: 10.1007/s10974-019-09531-z.
- Aguilar, H. N., & Mitchell, B. F. (2010). Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update*, 16(6), 725-744. doi:10.1093/humupd/dmq016.
- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A. CGTP Collaborators. (2019). The concise guide to Pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 176(S1), S21-S141. doi:10.1111/bph.14748.
- Allerton, T., Proctor, D., Stephens, J., Dugas, T., Spielmann, G., & Irving, B. (2018). L-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health. *Nutrients*, 10(7), 921. doi:10.3390/nu10070921.
- Althoff, T. F., & Offermanns, S. (2015). G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells — implications for vascular disease. *J Mol Med*, 93, 973-981. doi:10.1007/s00109-015-1305-z.
- Alvares, T., Meirelles, C., Bhambhani, Y., Paschoalin, V., & Gomes, P. (2011). L-Arginine as a potential ergogenic aid in healthy subjects. *Sports Med*, 41(3), 233-248. doi:10.2165/11538590-000000000-00000.
- Alvares, T., Monte-Junior, C., & Silva, J. (2012). Acute L-Arginine supplementation does not increase nitric oxide production in healthy subjects. *Nutr. Metab*, 9(54).
- Amane, H. S., Kaore, N. M., & Kaore, S. N. (2013). Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(1), 35-50. doi:10.1111/j.1472-8206.2012.01059.x.
- Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine. *Acta Physiol (Oxf)*. 2021 Mar;231(3):e13572. doi: 10.1111/apha.13572. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33089645.
- Barber, D., & Miller, V. (1997). Gender differences in endothelium-dependent relaxation do not involve NO in porcine coronary arteries. *Am J Physiol*, 273, H2325-H2332.
- Barr FE, Tirona RG, Taylor MB, Rice G, Arnold J, Cunningham G, Smith HA, Campbell A, Canter JA, Christian KG, Drinkwater DC, Scholl F, Kavanaugh-McHugh A, Summar ML (2007). Pharmacokinetics and safety of intravenously administered citrulline in children undergoing congenital heart surgery: potential therapy for postoperative pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 134(2):319-26. doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.02.043.

-
- Bassil, M. & Anand-Srivastava M. (2006). Nitric oxide modulates Gi-protein expression and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine*, 41(7), 1162-1173.
- Bassil, M., & Anand-Srivastava, M. (2007). Cyclic GMP modulates the expression of Gi protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells doi: 10.1385/cbb:47:1:99. PMID: 17406063. *Cell Biochem Biophys*, 47(1), 99-108. doi:10.1385/cbb:47:1:99.
- Bastin, G., & Heximer, S. P. (2011). Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. *Arch Biochem Biophys*, 510(2), 182-189. doi:10.1016/j.abb.2011.05.008.
- Berra-Romani, R., Raqeeb, A., Guzman-Silva, A., Torres-Jácome, J., Tanzi, F., & Moccia, F. (2010). Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to Ca²⁺ extrusion in ATP-stimulated endothelium of intact rat aorta. *Biochemical and biophysical research communications*, 395(1), 126-130. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.153.
- Berridge, M., Bootman, M., & Roderick, L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4, 517-529. doi:10.1038/nrm1155.
- Béscos, R., Sureda, A., Tur, J., & Pons, A. (2012). The Effect of Nitric-Oxide-Related Supplements on Human Performance. *Sports Med*, 42(2), 99-117. doi:0112-1642/12/0002-0099/\$49.95/0.
- Boese, A. C., Kim, S. C., Yin, K. J., Lee, J. P., & Hamblin, M. H. (2017). Sex differences in vascular physiology and pathophysiology: estrogen and androgen signaling in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 313 (3), H524-H545. doi:10.1152/ajpheart.00217.2016.
- Bouiillane, O., Melchior, J., & et al. (2019). Impact of 3-week citrulline supplementation on postprandial protein metabolism in malnourished older patients: The Ciproage randomized controlled trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 38(2), 564-574. doi:10.1016/j.clnu.2018.02.017.
- Brini, M., Calí, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *The FEBS journal*, 280(21), 5385-5397. doi:10.1111/febs.12193.
- Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. (2016). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacol Rev*. 68(2):476-532. doi: 10.1124/pr.115.010652.
- Burgoyne, J., & Eaton, P. (2010). Oxidant sensing by protein kinases a and g enables integration of cell redox state with phosphoregulation . *Sensors (Basel)*, 10(4), 2731-2751. doi: 10.3390/s100402731
- Caballero-García, A., Pascual, F., Noriega, G., Bellos, H., Pons, B., Roche, E., & Cordova, M. (2021). L-Citrulline Supplementation and Exercise in the Magement of Sarcopenia. *Nutrients*, 13(9), 3133. doi:10.3390/nu13093133.

- Calebiro, D., Koszegi, Z., Lanoiselee, Y., Miljus, T., & O'Brien, S. (2021). G protein-coupled receptor-G protein interactions: a single-molecule perspective. *Physiol Rev*, *101*(3), 857-906. doi:10.1152/physrev.00021.2020.
- Cheng, D. Y., Feng, C. J., Kadowitz, P. J., & Gruetter, C.A. (1994). Effects of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta. *Life sciences*, *55*(10), PL187-PL191. doi: 10.1016/0024-3205(94)00568-0.
- Cinelli MA, D. H., Miley GP, Silverman RB. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*, *40*(1), 158-189. doi:10.1002/med.21599.
- Consigny, P. M. (1991). Vascular smooth muscle contraction and relaxation: pathways and chemical modulation. *J Vasc Interv Radiol*, *2*(3), 309-317. doi: 10.1016/s1051-0443(91)72249-5.
- Costa TJ, Barros PR, Duarte DA, Silva-Neto JA, Hott SC, Santos-Silva T, Costa-Neto CM, Gomes FV, Akamine EH, McCarthy CG, Jimenez-Altayó F, Dantas AP, Tostes RC. Carotid dysfunction in senescent female mice is mediated by increased α 1A-adrenoceptor activity and COX-derived vasoconstrictor prostanoids. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023 Apr 1;324(4):H417-H429. doi: 10.1152/ajpheart.00495.2022.
- Couchet, M., Pestour, S., Breuillard, C., Corne, C., Rendu, J., Fontaine, E., & Moinard, C. (2022). Regulation of citrulline synthesis in human enterocytes: Role of hypoxia and inflammation. *BioFactors (Oxford, England)*, *48*(1), 181–189. Retrieved from doi:10.1002/biof.1810
- Curis, E., Nicolis, I., Moinard, C., Osowska, S., Zerrouk, N., Benazeth, S., & Cynober, L. (2005). Almost all about citrulline in mammals. *Amino acids*, *29*(3), 177-205. doi:10.1007/s00726-005-0235-4.
- Dieter, R. S., Dieter, R. A., & Dieter, R. A. (2019). *Diseases of the aorta*. Springer.
- Dikalova, A., Aschner, J., Kaplowitz, M., Cunningham, G., Summar, M., & Fike, C. (2020). Combined l-citrulline and tetrahydrobiopterin therapy improves NO signaling and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn pigs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. *318*(4), L762-L772. doi:10.1152/ajplung.00280.2019
- Dimitris, T., Anna-Maria, Kampoli., Costas, Tentolouris., Christodoulos, S. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function *Current Vascular Pharmacology*, *10*(1), 4-18.
- Evans, R., Fernstrom, J., Thompson, J., Morris, S., & Kuller, L. (2004). Biochemical responses of healthy subjects during dietary supplementation with L-arginine. *J. Nutr Biochem*, *15*, 534-539.
- Figuroa, A., Sanchez-Gonzalez, M. A., Wong, A., & Arjmandi, B. H. (2012). Watermelon extract supplementation reduces ankle blood pressure and carotid augmentation index in obese adults with prehypertension or hypertension. *Am J Hyper*, *25*(6), 640-643. doi: 10.1038/ajh.2012.20.
- Figuroa, A., Wong, A., Hooshmand, S., & Sanchez-Gonzalez, M. A. (2013). Effects of watermelon supplementation on arterial stiffness and wave reflection amplitude in postmenopausal women. *Menopause (New York, N.Y.)*, *20*(5), 573-577.

- Figueroa, A., Wong, A., Jaime, S. J., & Gonzales, J. U. (2017). Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance. / *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(1), 92–98. Retrieved from doi:10.1097/mco.0000000000000340.
- Figueroa, A., Jaime, S., Morita, M., Gonzales, J., & Moinard, C. (2020). L-Citrulline Supports Vascular and Muscular Benefits of Exercise Training in Older Adults. . *Exerc Sport Sci Rev*, 48(3), 133-139. doi:10.1249/JES.0000000000000223
- Fike, C., Summar, M., & Aschner, J. (2014). L-citrulline provides a novel strategy for treating chronic pulmonary hypertension in newborn infants. *Acta paediatrica*, 103(10), 1019-1026. doi: 10.1111/apa.12707
- Forstermann, U., & Sessa, W. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Fosstermann, U., & Munzel, T. (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), 1708-1714. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532
- Gambardella, J., Khondkar, W., Moreli, M., Wang, X., Santulli, G., & Trimarco, V. (2020). Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*, 8, 277. doi:10.3390/biomedicines8080277
- Gao, Y. (2022). *Biology of Vascular Smooth Muscle : Vasoconstriction and Dilatation* (2nd ed.). Springer .
- Geiger, M. (2019). *Fundamentals of Vascular Biology*. Vienna, Austria: Ed. Springer Nature.
- Ginguay, A., Regazzetti, A., & Laprevote, O. (2019). Citrulline prevents age-related LTP decline in old rats. *Scientific reports*, 9(1), 1-10. doi:10.1038/s41598-019-56598-2
- Gohla, A., Schultz, G., & Offermanns, S. (2000). Role for G12/G13 in Agonist-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Contraction. *Circulation Research*, 87(3), 221-227. doi:10.1161/01.RES.87.3.221
- Gonzalez, A., Townsend, J., Pinzone, A., & Hoffman, J. (2023). Supplementation with Nitric Oxide Precursors for Strength Performance: A Review of the Current Literature. *Nutrients*, 15(3). doi:10.3390/nu15030660
- Gonzalez AM, Trexler ET. (2020). Effects of Citrulline Supplementation on Exercise Performance in Humans: A Review of the Current Literature. *J Strength Cond Res*. 34(5):1480-1495. doi: 10.1519/JSC.00000000000003426.
- Gough, L., Sparks, S., McNaughton, L., Higgins, M., Newbury, J., Trexler, E., Bridge, C. (2021). A critical review of citrulline malate supplementation and exercise performance. *European journal of applied physiology*, 121(12), 3283-3295. doi:10.1007/s00421-021-04774-6
- Gramaglia, I., Velez, J., & Chang, Y. (2019). Citrulline protects mice from experimental cerebral malaria by ameliorating hypoargininemia, urea cycle changes and vascular leak. *PloS one*, 14(3), 1-16. doi:10.1371/journal.

- Grimble. G. (2007). Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids. *The J. Nutr*, 137(6 Suppl 2), 1693S-1701S. doi:10.1093/jn/137.6.1693S.
- Hansen, K., & Nedrgaard, O. (2000). Methodologic aspects of acetylcholine-evoked relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Toxicol*, 41, 153-159.
- Hinojosa-Laborde C, Chapa I, Lange D, Haywood JR. (1999) Gender differences in sympathetic nervous system regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(2):122–126.
- Hofmann, F., Ammendola, A., & Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*, 113(Pte 10), 1671-1676.
- Hotta, Y., Shiota, A., Kataoka, T., & Motonari, M. (2014). Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats. *Int J Urol*, 21(6), 608-612. doi:10.1111/iju.12362.
- Jalil, J., Lavandero, S., Chiong, M., & Paz, M. (2005). La vía de señalización Rho/Rho-cinasa en la enfermedad y el remodelado cardiovascular. *Rev Española de Cardiología*, 58(8), 951-961. doi: 10.1157/13078132.
- Jeremy, R., McCarron, H., & Sullivan, D. (1996). Effects of dietary L-arginine on atherosclerosis and endothelium-dependent vasodilatation in the hypercholesterolemic rabbit. Response according to treatment duration, anatomic site, and sex. *Circulation*, 94(3), 498-506. doi:doi:10.1161/01.cir.94.3.498.
- Jia G, Aroor AR, Jia C, Sowers JR. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. (2019). *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865(7):1802-1809. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.008.
- Joshi, V., Joshi, M., Silwal, D., Noonan, K., Rodriguez, S., & Penalosa, A. (2019). Systematized biosynthesis and catabolism regulate citrulline accumulation in watermelon. *Phytochemistry*, 162, 129–140. doi:10.1016/j.phytochem.2019.03.003.
- Kaore SN, Amane HS, Kaore NM. (2013). Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundam Clin Pharmacol*, (1):35-50. doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01059.x.
- Kauser, K., & Rubanyi, G. (1995). Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 25 (4 Pte 1), 517-523. doi:10.1161/01.hyp.25.4.517.
- Keynes, R., Aidley, D., & Huang, C. (2011). *Smooth Muscle: Nerve and Muscle* (4rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781108860789.016.
- Khalaf, D., Kruger, M., Wehland, M., Infanger, M., & Grimm, D. (2019). The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients*, 11(7), 2-14. doi: 10.3390/nu11071679.
- Kim IY, S. S., Schrader A, Spencer HJ, Azhar G, Deutz NE, Wolfe RR. (2015). Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(11), E915-924. doi:10.1152/ajpendo.00339.2015

- Klabunde, R. E. (2021). *Cardiovascular Physiology Concepts* (3rd ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y, Fujishima M. (1989). Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*.14(5):542-8. doi: 10.1161/01.hyp.14.5.542.
- Latek, D., Modzelewska, A., Trzaskowski, B., Palczewski, K., & Filipek, S. (2012). G protein-coupled receptors - recent advances. *Acta Biochim Pol*, 59(4), 515-529.
- Levy, A., Chung, J., Kroetsch, J., & Rush, J. (2009). Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension. *Vascular health and risk management*, 5, 1075-1087. doi:10.2147/vhrm.s7464
- Li-Jiuan Shen, K. B., Wei-Chiang Shen. (2015). Accessibility of endothelial and inducible nitric oxide synthase to the intracellular citrulline-arginine regeneration pathway. *Biochem Pharmacol*, 69(1), 97-104. doi:10.1016/j.bcp.2004.09.003
- Llorens, S., Jordan, J., & Nava, E. (2002). The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J. Physiol. Biochem*, 58(3), 179-188. doi:10.1007/bf03179855.
- Luiking Y.C., Engelen M.P., Deutz N.E. (2010). Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 13: 97–104.
- Maric, S., Restin, T., Muff, J., Camargo, S., Guglielmetti, L., Holland, C., Billie, D. (2021). Citrulline, Biomarker of Enterocyte Functional Mass and Dietary Supplement. Metabolism, Transport, and Dietary Supplement. Metabolism. Transport, and Current Evidence for Clinical Use. *Nutrients*, 13(8), 2794. doi:10.3390/nu13082794
- Marquet-de Rougé, P., Clamagirand, C., Facchinetti, P., Rose, C., Sargueil, F., & Cynober, L. (2013). Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. *Age (Dordr)*; 35(5):1589-606. doi:10.1007/s11357-012-9462-2
- Martinez-Augustin O., S. d. M. F. (2004). Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm*, 45(4), 303-317.
- McCudden, C., Hains, M., Kimple, R., Siderovski, D., & Willard, F. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 551-577. doi:10.1007/s00018-004-4462-3
- Moinard, C., Nicolis, I., Neveux, N., Darquy, S., Bénazeth, S., & Cynober, L. (2008). Dose-ranging effects of citrulline administration on plasma amino acids and hormonal patterns in healthy subjects: the Citrudose pharmacokinetic study. *British Journal of Nutrition*, 99(4), 855-862. doi:10.1017/S0007114507841110
- Moncada, S., & Higgs, E. A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European journal of clinical investigation*, 21(4), 361-374. doi: 10.1111/j.1365-2362.1991.tb01383.x
- Mori, M., Gotoh, T. (2000). Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(3), 715-719. doi:10.1006/bbrc.2000.3169

- Nelson MT, Quayle JM. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 268:C799–C822.
- Ochiai M, H. T., Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K. (2012). Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. *Int J Cardiol*.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*, 83(2), 101-130. doi:10.1016/s0079-6107(03)00052-x
- Organización Mundial de la Salud (s.f). Enfermedades cardiovasculares. OMS. https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
- Palmer, R. M., Rees, DD., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*, 153(3), 1251-1256.
- Papadia C., Osowska S., Cynober, L., Forbes, A. (2018). Citrulline in health and disease. Review on human studies. *Clinical nutrition*, 37(2018), 1823-1828. 10.1016/j.clnu.2017.10.009.
- Park, H. Y., Kim, S. W., Seo, J., Jung, Y. P., Kim, H., Kim, A. J., Kim, S., Lim, K. (2023). Dietary Arginine and Citrulline Supplements for Cardiovascular Health and Athletic Performance: A Narrative Review. *Nutrients*, 15(5). Retrieved from doi:10.3390/nu15051268.
- Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve*, 35(4), 430-442. doi:10.1002/mus.20745.
- Peters, S. L., & Michel, M. C. (2003). cAMP-independent relaxation of smooth muscle cells via Gs-coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 368, 329-330. doi:10.1007/s00210-003-0816-2.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., & et al. (2001). G-proteins and Their Molecular Targets. In *Neuroscience* (2nd ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10799/>.
- Rashid, J., Kumar, S., Job, K., Liu, X., Fike, C., & Sherwin, C. (2020). Therapeutic Potential of Citrulline as an Arginine Supplement: A Clinical Pharmacology Review. *Paediatr Drugs*, 22(3), 279-293. doi:10.1007/s40272-020-00384.
- Reyes-García, J., Flores, E., Carbajal, A., Sommer, B., & Montaña, L. (2018). Maintenance of intracellular Ca²⁺ basal concentration in airway smooth muscle (Review). *Int J Mon Med*, 42(6), 2998-3008. doi:10.3892/ijmm.2018.3910
- Rodrigues-Krause J, K. M., Rocha IMGD, Umpierre D, Fayh APT. (2018). Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 15(2), 257-261. doi:10.1016/j.ijcard.2010.10.004.
- Romero, M., Platt, D., Caldwell, R., & Caldwell, R. (2006). Therapeutic use of citrulline in -cardiovascular disease. *Cardiovascular drug reviews*, 24(3-4), 275-290. doi:10.1111/j.1527-3466.2006.00275.x

-
- Roved, J., Westerdahl, H., & Hasselquist, D. (2017). Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and behavior*, 88, 95-105. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.11.017.
- Rubanyi, G., Curtis, S., Korach, K. (1997). Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *The Journal of Clinical Investigation*, 99(10), 2429-2437. doi:10.1172/JCI119426.
- Salud, O. M. (2022). *Enfermedades cardiovasculares*. México: OMS. Retrieved from https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
- Sanders, D., Kelley, T., & Larson, D. (2000). The role of nitric oxide synthase/nitric oxide in vascular smooth muscle control. *Perfusion*, 15(2), 97-104. doi:10.1177/026765910001500203.
- Schulman SP, B. L., Kass DA, Champion HC, Terrin ML, Forman S, Ernst KV, Kelemen MD, Townsend SN, Capriotti A, Hare JM, Gerstenblith G. (2006). L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA*, 295(1), 58-64. doi:10.1001/jama.295.1.58.
- Shimokawa, H., & Godo, S. (2019). Nitric Oxide and Endothelium-Dependent Hyperpolarization Mediated by Hydrogen Peroxide in Health and Disease. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 127, 92-101. Retrieved from doi:10.1111/bcpt.13377
- Shufelt CL, Pacheco C, Tweet MS, Miller VM. (2018). Sex-Specific Physiology and Cardiovascular Disease. *Adv Exp Med Biol*;1065:433-454. doi: 10.1007/978-3-319-77932-4_27.
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372(6503), 231-236. doi: 10.1038/372231a0
- Somlyo, A. P., Wu, X., Walker, L. A., & Somlyo, A. V. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Physiol Biochem Pharmacol*, 134, 201-234. doi:10.1007/3-540-64753-8_5
- Stanhewicz, A. E., Wenner, M. M., Stachenfeld, N. S. (2010). Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 315(6), H1569-H1588. doi:10.1152/ajpheart.00396.2018
- Sullivan, J. M., Fowlkes, L. P. (1996). Estrogens, menopause, and coronary artery disease. *Cardiology clinics*, 14(1), 105-116. doi:10.1016/s0733-8651(05)70264-2
- Syrovatkina, V., Alegre, K., Dey, R., & Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol*, 428(19), 3850-3868. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.002
- Szefel, J., Danielak, A., & Kruszewski, W. (2019). Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. *Advances in medical sciences*, 64(1), 104-110. doi:10.1016/j.advms.2018.08.018

-
- Topo, E. J., Califf, R. M., Prystowsky, E. N., Thomas, J. D., & Thompson, P. D. (2008). *Tratado de Medicina Cardiovascular* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Tousoulis, D., Kampoli, A., Tentolouris, C., & Stefanadis, C. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*, *10*(1), 4-18.
- Urschel, K., Shoveller, A., Uwiera, R., Pencharz, P., & Ball, R. (2006). Citrulline is an effective arginine precursor in enterally fed neonatal piglets. *The Journal of nutrition*, *136*(7), 1806-1813. doi:10.1093/jn/136.7.1806
- Vanhoutte, P., Shimokawa, H., Feletou, M., Tang, E. H. (2016). Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta physiologica (Oxford, England)*, *219*(1), 22-96. doi:10.1111/apha.12646
- Venkatakrishnan, A., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C., Schertler, G., & Babu, M. (2013). Molecular signatures of G protein-coupled receptors. *nature*, *494*, 185-194. doi:10.1038/nature11896
- Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L., & Taddei, S. (2009). Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes care*, *32*(Suppl 2(Suppl 2)), S314-S321. doi:10.2337/dc09-S330
- Viridis A, Taddei S. (2012). Endothelial aging and gender. *Maturitas*. *71*(4):326-30. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.01.010.
- Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. (1988). *J Cardiovasc Pharmacol*.*12* Suppl 5:S115-8.
- Webb, C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ*, *27*(1-4), 201-206. doi:10.1152/advan.00025.2003
- White, R. E. (2002). Estrogen and vascular function. *Vascular pharmacology*, *38*(2), 73-80. doi:10.1016/s0306-3623(02)00129-5
- Wu, G., Meininger, C., McNeal, C., Bazer, F., & Rhoads, J. (2021). Role of L-Arginine in Nitric Oxide Synthesis and Health in Humans. *Adv Exp Med Biol*. *1332*, 167-187. doi:10.1007/978-3-030-74180-8_10
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*, *129*(2), 83-94. doi:10.1016/j.jphs.2015.09.002