



Efeitos morfológicos e funcionais renais do uso de aminoácidos de cadeia ramificada: estudo experimental em ratos

Renal morphological and functional effects of branched-chain amino acids: an experimental study in rats

Fernando Issamu **TABUSHI**¹, Arthur Vinicius Vieira **LOPES**¹, Vicente Magalhães de **MASI**¹, Anna Victoria Valiente **ENGELHORN**¹, Maria Paula Queiroz Isaac **HORBYLON**¹, Andreia Akina **AKAMINE**¹, João Gabriel Cavazzani **DOUBEK**¹, Maria Angélica Baron **MAGALHÃES**¹.

RESUMO

Introdução: Atualmente, o uso dos aminoácidos de cadeia ramificada em dietas ergogênicas é indicado pelo seu potencial de aumentar o ganho de massa muscular em atletas e frequentadores de academias, estimular a secreção de insulina, reduzir a fadiga pós-exercício e diminuir o grau de lesão muscular.

Objetivos: Avaliar os efeitos morfológicos e funcionais renais decorrentes do seu uso em ratos.

Método: Foram estudados 24 ratos Wistar machos, distribuídos em grupo controle (n=12), que recebeu uma dose diária de 1 ml de água, e grupo estudo (n=12), que recebeu uma dose diária de 1 ml de solução em água contendo aminoácidos de cadeia ramificada. O experimento teve duração de 120 dias, sendo avaliada a função renal a cada 60 dias por meio da dosagem sérica de creatinina e ureia. Ao final do estudo, os animais foram submetidos à eutanásia e seus rins coletados para análise histopatológica.

Resultados: Não foram observadas diferenças (p<0,05) entre os grupos com relação aos parâmetros bioquímicos, como também não foram visualizadas alterações morfológicas ao exame histopatológico.

Conclusão: O uso de aminoácidos de cadeia ramificada na dose de 154 mg/kg/dia, durante 4 meses, não provocou alterações morfológicas e funcionais renais em ratos saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Aminoácidos de cadeia ramificada. Metabolismo rins. Suplementação alimentar.

INTRODUÇÃO

O termo aminoácidos de cadeia ramificada (AACR) refere-se à leucina, isoleucina e valina. Eles compõem 50% dos aminoácidos essenciais e, portanto, devem ser ingeridos por meio da dieta. Esses micronutrientes representam 35% de toda a proteína muscular. Além disso, estimulam – especialmente a leucina – a tradução do RNA-mensageiro em proteínas por meio da ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Os AACR servem ainda como fonte de nitrogênio para a formação de outros aminoácidos.¹

Atualmente, o seu uso em dietas ergogênicas é indicado pelo seu potencial de aumentar o ganho de massa muscular em atletas e frequentadores de academias, estimular a secreção de insulina, reduzir a fadiga pós-exercício e diminuir o grau de lesão muscular¹. Além disso, a suplementação com eles pode apresentar efeitos benéficos no tratamento de pacientes

com cirrose hepática, insuficiência renal crônica, sepse, câncer, trauma e queimaduras.²

Apesar de seus possíveis efeitos benéficos, a Universidade Americana de Medicina Esportiva e as Associações Dietéticas Canadense e Americana recomendam apenas dieta diária balanceada durante atividades físicas, sem a necessidade de suplementação alimentar.³ Ademais, os efeitos adversos do uso prolongado dos AACR no metabolismo não são bem definidos na literatura, bem como a sua dose recomendada⁴. Outro ponto a se considerar é a influência do consumo deles na glicemia, pois, apesar do efeito sinérgico entre os AACR e a insulina no crescimento muscular, estudos demonstram que níveis elevados desses aminoácidos estão relacionados com o aumento no risco de diabetes tipo 2.^{5,6} Além disso, seu uso em ratos com falência renal crônica, parece estar

relacionado com aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios e de fibrose no tecido renal.⁷

Apesar dos possíveis efeitos benéficos dos AACR nas situações descritas, faltam estudos para avaliar os possíveis efeitos deletérios da sua suplementação.² O rim, envolvido na metabolização inicial dos AACR, pode apresentar sobrecarga metabólica e evoluir com alterações morfológicas e funcionais em longo prazo.

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos morfológicos e funcionais renais decorrentes do uso de AACR em ratos.

MÉTODOS

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas técnicas de pesquisa e experimentação animal e com a Lei 11.794, de 8 outubro de 2008. O estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná sob o número 1435/2019.

Foram estudados 24 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, cepa Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina, com 2 meses de idade e peso superior a 350 g. Foram mantidos no biotério da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, sob o ciclo de luz e escuro a cada 12 h, onde receberam ração comercial para ratos (Nuvilab - Nuvital®) e água à vontade. Foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas compartilhadas, com 3 animais por gaiola. Eles permaneceram em período de adaptação e observação do estado de saúde durante 20 dias precedentes ao início da pesquisa, que durou 120 dias. Durante o estudo, foram avaliados diariamente quanto ao apetite, fezes urina, estado de alerta e peso. Não houve perdas e nenhum animal apresentou complicações clínicas durante o experimento.

Os 24 ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=12). No grupo controle (GC), cada um recebeu 1 ml de água por dia, por meio de gavagem. Já os animais do grupo estudo (GE), receberam 1 ml, por dia, de uma solução aquosa contendo AACR, pelo mesmo método, na dose de 154 mg/kg.

Durante todo o estudo, foi utilizada a mesma marca de AACR na proporção de 2:1:1 de leucina, isoleucina e valina, respectivamente. Para a preparação das doses diárias, foi utilizada balança de precisão Analítica AG200-Gehaka®. Foi mensurado e separado em recipientes, 646,8 mg do suplemento, que equivale a dose total diária para os 12 animais. Esse processo foi repetido 120 vezes, correspondente ao total de 120 dias do experimento. A cada dia foi utilizado um dos recipientes contendo 646,8 mg de AACR. No momento da administração do suplemento a dose foi diluída em 12 ml de água utilizando pipeta. Com a solução preparada foi utilizada seringa de 1 ml para administrar a solução para cada animal do GE por gavagem.

Durante o período de acompanhamento, foram realizados exames hematológicos para avaliação da função renal, por meio de aferição de creatinina e ureia séricas. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue, mediante punção na veia jugular. Foram realizadas 3

coletas de sangue durante todo o experimento no 1º, 60º e 120º dia.

No final, os animais foram submetidos a eutanásia por overdose anestésica de isoflurano via inalatória em dose 3 vezes maior que a utilizada para sedação (3-5%), e foram descartados de acordo com a rotina do biotério. Os rins de todos os animais foram removidos e encaminhados para confecção de lâminas e análise do laboratório de anatomopatologia. As peças anatômicas foram fixadas em formaldeído 10% e preparadas seguindo as técnicas histológicas de rotina. As lâminas foram preparadas com cortes de 4 µm e coradas com H&E.

Para verificação das hipóteses relacionadas com o aumento do metabolismo do rim pelo uso de AACR, na análise histológica, foram consideradas a presença de hipertrofia glomerular e das estruturas do néfron, como esclerose glomerular, hialinose, degeneração hialina, hialinose arteriolar e lesões de Kimmelstiel-Wilson.^{23,24}

Análise estatística

Os resultados dos parâmetros bioquímicos foram descritos por médias, desvios-padrão, mediana, valores mínimos e máximos. Para variáveis categóricas foram apresentados frequências e percentuais. A comparação dos grupos controle e estudo, em relação às variáveis do estudo, foi feito usando-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para a comparação das avaliações dos dias 0, 60 e 120, dentro de cada grupo, foi usado o teste não-paramétrico de Friedman. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Para as comparações múltiplas dos tempos de avaliação os valores de p foram corrigidos por Bonferroni. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0 Armonk, NY: IBM Corp.

RESULTADOS

Em relação aos valores de ureia, considerando o valor normal de referência de 11,4 a 19,30 mg/dl, tanto o GC quanto o GE apresentaram médias superiores aos valores de normalidade. Foi observada diferença entre os 2 grupos somente no momento D60 ($p=0,014$, Figura 1)

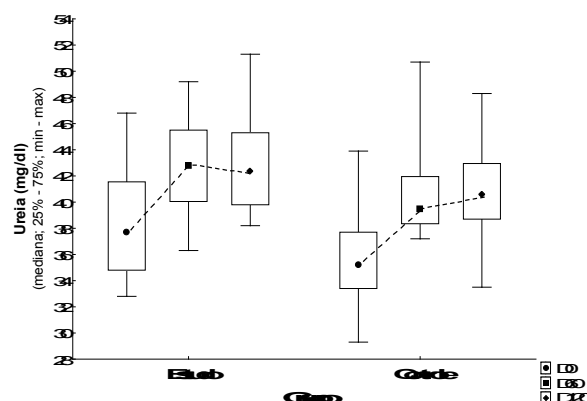


FIGURA 1 - Representação da evolução da ureia grupo estudo x grupo controle

Quanto a creatinina, considerando o valor normal de referência de 0,2 a 0,8 mg/dl, não houve diferença

entre os grupos em todos os momentos avaliados ($p > 0,05$, Figura 2)

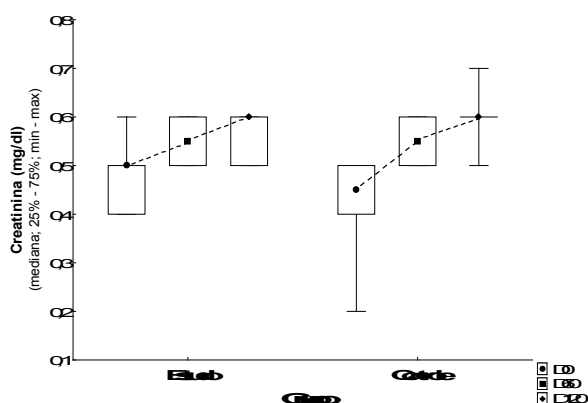


FIGURA 2 - Representação da evolução de creatinina grupo estudo x grupo controle

Após análise das lâminas histológicas confeccionadas não foram observadas quaisquer alterações tanto focais como globais em ambos os grupos. Os órgãos apresentavam morfologias anatômicas e não possuíam diferenças significativas entre o grupo controle e estudo (Figura 3).

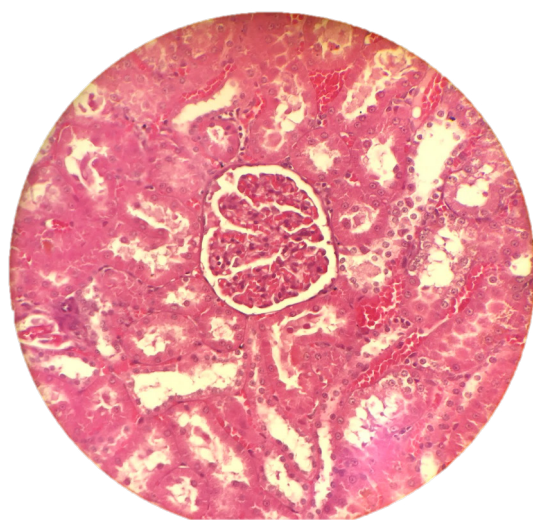


FIGURA 3 - Corte histológico de rim de um animal do grupo estudo, com aspectos normais (H&E 40x)

DISCUSSÃO

Os AACR, leucina, isoleucina e valina, compõem um grupo de aminoácidos essenciais com propriedades ergogênicas, intimamente relacionados com o aumento da síntese proteica muscular. Devido a isso, ganharam destaque entre esportistas que buscam melhora do desempenho físico.

Ademais, as propriedades proteinogênicas delas, despertaram o interesse da comunidade científica, que busca entender o papel desses nutrientes como suplementação alimentar em doenças que cursam com proteólise e perda de massa muscular. Além disso, buscam compreender de maneira integral a relação dos AACR com os diversos sistemas do organismo humano e os possíveis prejuízos associados à sua metabolização.

Sabe-se, que os AACR passam por processo de transaminação inicial no rim e sistema musculoesquelético

mediado pela enzima ATACR. Em seguida, sofrem ação do complexo enzimático DCCR, que possui ação predominante no fígado. Após a segunda reação o produto de cada aminoácido passa por vias finais diferentes. O aumento da síntese proteica fica à cargo da leucina, responsável por ativar o complexo mTOR, induzindo a transcrição de RNAm em proteínas.¹

Estudos mostram que grande parte dos frequentadores de academias usam algum tipo de suplementação e que esta geralmente não é acompanhada profissionalmente. Além disso, a escolha e dosagem destes suplementos é feita de forma empírica, sem respaldo científico.^{11,12,13}

Trabalhos mostram que aumento proteico na dieta, além do recomendado diariamente, não melhora o ganho muscular e a função física geral. Existe relação entre a secreção alterada de insulina e glucagon e dietas hiperproteicas, revelando possível via patogênica para o surgimento de diabetes melito ou disfunções no metabolismo da glicose.¹⁸

No presente estudo, não houve diferença entre os grupos em relação aos valores de creatinina. Já em relação a ureia, houve diferenças significativa somente no D60, porém que não se mantiveram em D120. É possível que tenha ocorrido sobrecarga renal devido à suplementação com AACR aos 60 dias; porém, devido à alta capacidade de adaptação das células renais, esses valores podem ter se normalizado posteriormente. Não existe na literatura estudos experimentais que correlacionem função renal com a suplementação por AACR. Sabe-se, no entanto, que o rim, como forma compensatória, é capaz de aumentar a taxa de filtração glomerular e o fluxo plasmático renal quando submetido à dieta hiperproteica. Por conta desses mecanismos, possivelmente, o órgão não sofreu alterações funcionais em função do excesso metabólico de AACR.⁷

Quanto às diferenças entre os momentos de avaliação, ambos os grupos apresentaram aumento dos valores de creatinina e ureia no decorrer do estudo, porém sem diferença entre eles. Esse aumento nos marcadores de função renal pode ter ocorrido devido à falta de jejum de pelo menos oito horas antes da coleta. Sabe-se que os valores de ureia sérica são muito sensíveis à dieta sofrendo alterações de acordo com o tipo e horário de alimento consumido. Além disso, ocorre aumento fisiológico nos valores de creatinina e ureia proporcional ao ganho de peso e massa muscular. O fato de essa diferença não ser significativa entre os dois grupos, mostra que essa elevação foi constante e não modificada pela dieta hiperproteica.²⁶

Não foram encontradas alterações morfológicas nos rins do grupo estudo e controle. Esses dados sugerem que a suplementação com AACR durante 4 meses, na dose utilizada neste estudo, não cause alterações no parênquima renal, visíveis na coloração por H&E.

Esse resultado não corrobora outros estudos experimentais em condições semelhantes. Em estudo realizado com ratos com taxas de filtração glomerular reduzida, evidenciou-se, por imunoistoquímica, aumento dos marcadores de fibrose tecidual, como alfa actina de tecido muscular liso, decorrentes da suplementação com AACR.⁷ A avaliação imunoistoquímica é mais sensível que o estudo por H&E e detecta alterações morfológicas mais precocemente. Isso pode explicar a razão de não terem

sido encontradas alterações histológicas no presente estudo, já que foi realizada apenas análise por H&E. Além disso, é possível que a dose utilizada tenha sido insuficiente para causar lesões no parênquima renal de animais saudáveis durante o tempo avaliado. Porém, no referido artigo foi estudado o efeito da suplementação de AACR em animais já submetidos a nefrectomia parcial de 5/6. Portanto, os animais estudados não possuíam rins funcionais, tornando-os mais sensíveis a fatores que causem sobrecarga renal.⁷

Os resultados demonstram que no decorrer de 120 dias de administração diária de AACR, alterações bioquímicas e morfológicas não puderam ser comprovadas em ratos em condições fisiológicas. Atribuímos a ausência de evidências a fatores como dose e posologia, tempo de estudo e metodologia utilizada.

Deve-se ressaltar que não é consenso na literatura a dose ideal, bem como a posologia de administração dos AACR. Nessa pesquisa, foi levado em consideração um estudo experimental que aponta a dose mínima efetiva para aumento plasmático de AACR, um dos poucos encontrados sobre o tema. No entanto, na prática, esse suplemento é consumido de maneira indiscriminada e abusiva, seja de maneira isolada ou associada com outros produtos. O tempo de estudo deste trabalho pode ser insuficiente, quando comparado aos atletas que fazem uso de AACR por tempo indefinido.

Por fim, outros estudos demonstraram resultados diferentes quando realizados com outras colorações e avaliados por outros métodos.⁷ Portanto, a administração de AACR pode ter outras repercussões com maior tempo de estudo, dose e em outras condições clínicas, como demonstra a literatura. Além disso, a avaliação morfológica limitada a coloração H&E impossibilita a visualização de marcadores de fibrose ou outras alterações de nível molecular, impedindo análise destes no tecido renal.

CONCLUSÕES

O uso de aminoácidos de cadeia ramificada na dose de 154 mg/kg/dia, durante 4 meses, não provocou alterações morfológicas e funcionais renais em ratos saudáveis.

Trabalho realizado na

¹ Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Correspondência:

Fernando Issamu Tabushi
Email: ftabushi@hotmail.com

Conflito de interesse: Nenhum
Financiamento: Nenhum

Contribuição dos autores

Concepção: Fernando Issamu Tabushi
Análise formal: Arthur Vinicius Vieira Lopes
Investigação: Vicente Magalhães de Masi
Metodologia: Anna Victoria Valiente Engelhorn
Administração do projeto: Maria Paula Queiroz Isaac Horbylon
Supervisão: Maria Paula Queiroz Isaac Horbylon
Redação (esboço original): João Gabriel Cavazzani Doubek
Redação (revisão e edição): Maria Angélica Baron Magalhães

REFERÊNCIAS

1. Rogero M, Tirapegui J. Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008;44(4):563-575.
2. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism*. 2018;15(1).
3. American Dietetic Association, Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine, et al. American College of Sports Medicine position stand. Nutrition and athletic performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2009 Mar;41(3):709-731. DOI: 10.1249/mss.0b013e31890eb86. PMID: 19225360.
4. Harper, A. E., Miller, R.H. & Block, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1984;4:409-54
5. Flores-Guerrero J, Osté M, Kieneker L, Gruppen E, Wolak-Dinsmore J, Otvos J et al. Plasma Branched-Chain Amino Acids and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Results from the PREViD Prospective Cohort Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2018;7(12):513.
6. O'Connell T. The Complex Role of Branched Chain Amino Acids in Diabetes and Cancer. *Metabolites*. 2013;3(4):931-945.
7. Pillai S, Herzog B, Seebeck P, Pellegrini G, Roth E, Verrey F. Differential Impact of Dietary Branched Chain and Aromatic Amino Acids on Chronic Kidney Disease Progression in Rats. *Frontiers in Physiology*. 2019;10.
8. El Khoury D, Antoine-Jonville S. Intake of Nutritional Supplements among People Exercising in Gyms in Beirut City. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012;2012:1-12.
9. Moreira F, Rodrigues K. Conhecimento nutricional e suplementação alimentar por praticantes de exercícios físicos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2014;20(5):370-373.
10. Ruano J, Teixeira V. Prevalence of dietary supplement use by gym members in Portugal and associated factors. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2020;17(1).
11. Cava T, Madruga S, Teixeira G, Reichert F, Silva M, Rombaldi A et al. Consumo excessivo de suplementos nutricionais entre profissionais atuantes em academias de ginástica de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2012*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2017;26(01):99-108.
12. Attlee A, Haider A, Hassan A, Alzamil N, Hashim M, Obaid R. Dietary Supplement Intake and Associated Factors Among Gym Users in a University Community. *Journal of Dietary Supplements*. 2017;15(1):88-97.
13. Radwan H, Hasan H, Ghanem I, Alhajjar G, Shabir A, Alshamsi A et al. Prevalence of Dietary Supplement Use and Associated Factors Among College Students in the United Arab Emirates. *Journal of Community Health*. 2019;44(6):1135-1140.
14. Abo Ali E, Elgamel H. Use of dietary supplements among gym trainees in Tanta city, Egypt [Internet]. *Pub Med*. 2022 [cited 4 September 2022]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28145991/>
15. Goston J, Toulson Davisson Correia M. Intake of nutritional supplements among people exercising in gyms and influencing factors. *Nutrition*. 2010;26(6):604-611.
16. Pallottini, Ana Carolina. Aminoácidos de cadeia ramificada: consumo dietético e associação com fatores de risco cardiometabólicos em residentes de São Paulo [dissertation]. São Paulo: University of São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2017 [cited 2022-09-04]. doi:10.11606/D.6.2017.tde-02082017-145210.
17. Mittendorfer B, Klein S, Fontana L. A word of caution against excessive protein intake. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;16(1):59-66.
18. Almeida C, Alvares T, Costa M, Conte-Junior C. Protein and Amino Acid Profiles of Different Whey Protein Supplements. *Journal of Dietary Supplements*. 2015;13(3):313-323.
19. Garlick P, Grant I. Amino acid infusion increases the sensitivity of muscle protein synthesis in vivo to insulin. Effect of branched-chain amino acids. *Biochemical Journal*. 1988;254(2):579-584.
20. Li J, Jefferson L. Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1978;544(2):351-359.
21. Shimomura Y, Yamamoto Y, Bajotto G, Sato J, Murakami T, Shimomura N et al. Nutritional Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *The Journal of Nutrition*. 2006;136(2):529S-532S.
22. Park J, Tak W, Park S, Kweon Y, Jang S, Lee Y et al. Effects of branched-chain amino acids (BCAAs) on the progression of advanced liver disease. *Medicine*. 2017;96(24):e6580.
23. Gross J, de Azevedo M, Silveiro S, Canani L, Caramori M, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care*. 2005;28(1):164-176.
24. Smith M. Pathologic Classification of Diabetic Nephropathy. *Yearbook of Pathology and Laboratory Medicine*. 2011;2011:157-159.
25. Delanaye P, Cavalier E, Pottel H. Serum Creatinine: Not So Simple!. *Nephron*. 2017;136(4):302-308.