

# Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada e alteração na concentração da serotonina cerebral

## *BCAA supplementation and changes in cerebral serotonin concentration*

### ABSTRACT

ROSSI, L.; CASTRO, I.A.; TIRAPEGUI, J. BCAA supplementation and changes in cerebral serotonin concentration. *Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP. v.26, p. 1-10, dez., 2003.

*This paper reports the effect of chronic supplementation with branched chain amino acids (BCAA) and the synthesis of hypothalamic serotonin. We found a significant ( $p < 0.05$ ) reduction of 20.4% on serotonin brain concentration in Wistar rats after 6 weeks of supplementation. We also argue on the use of indirect parameters, like total or free tryptophan, for monitoring of the serotonergic function of human beings when dietetic changes (hyperproteic diets) are in use.*

**Keywords: proteins; supplementation; branched-chain amino acids; tryptophan; serotonin**

**LUCIANA ROSSI<sup>1</sup>; INAR ALVES DE CASTRO<sup>2</sup>; JULIO TIRAPEGUI<sup>3</sup>**  
<sup>1,2,3</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

**Endereço para correspondência:**  
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bl. 14  
CEP 05508-900  
São Paulo, SP  
e-mail: tirapegu@usp.br

**Agradecimentos**  
Ao Prof. Dr. Luís Fernando Bicudo Costa Rosa do ICB/USP. Capes e CNPq pelas bolsas outorgadas, FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMEN

*Se presentan los resultados de un estudio que investigó el efecto del suplemento crónico de la dieta con aminoácidos de cadena ramificada (ACR) en la síntesis de serotonina cerebral. Se observó una reducción significativa de 20% en la concentración de la serotonina cerebral en ratas Wistar después de seis semanas. Se discute el uso de parámetros indirectos, como el triptófano total y libre para el control de la función serotoninérgica en humanos, cuando se introducen alteraciones en la dieta habitual (dietas hiperproteicas).*

**Palabras clave: proteínas; suplemento; aminoácidos de cadena ramificada; triptófano; serotonina**

## RESUMO

*Este trabalho apresenta os resultados de um estudo que investigou o efeito da suplementação crônica com aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) e a síntese de serotonina hipotalâmica. Obteve-se, neste experimento, uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) de 20% na concentração de serotonina cerebral em ratos Wistar após 6 semanas de suplementação. Também discutimos o uso de parâmetros indiretos, como o triptofano total e livre, para a monitoração da função serotoninérgica em seres humanos, quando se empregam alterações dietéticas (dietas hiperprotéicas) no padrão alimentar.*

**Palavras-chave: proteínas; suplementação; aminoácidos de cadeia ramificada; triptofano; serotonina**

## INTRODUÇÃO

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) pertence ao grupo das aminas biogênicas (neurotransmissores), que incluem também as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), sendo sintetizadas, na sua grande maioria, a partir da decarboxilação de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano). A serotonina é obtida do aminoácido essencial triptofano (MEEUSEN e DE MEIRLEIR, 1995).

Os níveis de serotonina cerebral estão relacionados às alterações de comportamento e humor: ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga, supressão de apetite, etc. Os mecanismos bioquímicos precisos pelos quais os neurônios serotoninérgicos participam destas funções ainda não estão totalmente esclarecidos (BELL et al., 2001). Existem, tanto em humanos como em animais, evidências de que a produção de serotonina cerebral pode ser modulada dieteticamente através da oferta de macronutrientes, destacando-se principalmente a ingestão de carboidratos, de proteínas e de aminoácidos isolados, especificamente o triptofano (CUNLIFFE et al., 1997, 1998; BLUNDELL, 1992; LYONS e TRUSWELL, 1988).

No plasma, o triptofano circula livre (10%), mas principalmente ligado à albumina (90%). Na barreira hematoencefálica, o triptofano livre ( $TRP_L$ ) compete com outros cinco aminoácidos (aminoácidos neutros: AN) para seu transporte e conseqüente síntese de serotonina cerebral. Os cinco aminoácidos competidores são: leucina, isoleucina e valina (aminoácidos de cadeia ramificada: ACR), além da tirosina e fenilalanina (WURTMAN e FERNSTROM, 1975). O aumento no plasma da parcela do triptofano livre ( $TRP_L$ ) resulta no maior transporte e síntese do seu respectivo neurotransmissor (5-HT:serotonina) (ROSSI e TIRAPÉGUI, 1999). Uma abordagem utilizada na investigação da captação cerebral de triptofano é a determinação da proporção plasmática entre TRP e a soma dos aminoácidos neutros (AN):  $TRP/\sum AN$ . Os mecanismos que promovem o aumento da razão entre TRP provavelmente estimulam a síntese de serotonina cerebral. A avaliação indireta da síntese de serotonina cerebral é utilizada principalmente em humanos, devido à impossibilidade de determinações diretas da mesma.

A síntese de serotonina cerebral pode ser modulada por três fatores: quantidade de triptofano total no plasma (proporção entre a parcela livre e a ligada à albumina); transporte de triptofano livre pela barreira hematoencefálica contra seus competidores ( $TRP/\sum AN$ ); e a atividade da enzima triptofano hidroxilase (PARDRIDGE e CHOI, 1986). Os dois primeiros mecanismos possuem possibilidade de modulação via dieta.

FERNSTROM e WURTMAN (1972) foram os primeiros a abordar a relação entre ingestão protéica e síntese de serotonina cerebral. O consumo de uma dieta hiperprotéica tende a diminuir a proporção  $TRP/\sum AN$ . O triptofano é o aminoácido em menor concentração nas proteínas (1% do total protéico); ainda antes de alcançar a circulação, grande parte do triptofano é metabolizada no fígado. Segundo LYONS e TRUSWELL (1988), em uma dieta normal a ingestão de triptofano representa cerca de 1g/dia. Assim, a oferta de

uma dieta protéica favoreceria o aumento dos aminoácidos competidores. Pela menor concentração dietética de triptofano haveria menor captação do mesmo na barreira aminoacídica cerebral e provável redução da função da serotonina.

Estudos recentes da relação entre serotonina e alterações nas condições psiquiátricas foram realizados utilizando a técnica conhecida como “depleção de triptofano”. Em humanos esta técnica consiste na oferta de dieta hipoprotéica, uma carga protéica (alta concentração AN) deficiente em triptofano. BELL et al. (2001) assinalam que em estudos utilizando a depleção de triptofano em indivíduos saudáveis foram observadas alterações comportamentais e de humor.

Os objetivos deste estudo são: primeiramente avaliar, em ratos Wistar adultos, parâmetros biométricos (consumo e ganho de peso) quando da oferta de ração suplementada com 50% de aminoácidos de cadeia ramificada, durante 6 semanas; e, em segundo lugar, avaliar o efeito desta suplementação em parâmetros bioquímicos (glicose, insulina, triptofano total plasmático) e na concentração da serotonina cerebral. Com os resultados obtidos pretende-se discutir os potenciais efeitos da suplementação de ACR e as limitações do modelo empregado para estudos indiretos da avaliação da serotonina cerebral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos adultos (~200g), provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, obedecendo a um ciclo diário de 12h claro-escuro. Fase clara: das 7:00h às 19:00h. No primeiro dia os animais foram separados em dois grupos sedentários: um controle (CONT), consumindo ração balanceada sem suplementação, e outro suplementado (SUPL), com ração acrescida de 50% de cada ACR.

### SUPLEMENTAÇÃO

Duas formulações de rações foram preparadas, conforme estipulado pelo *American Institute of Nutrition* (AIN) (REEVES et al., 1993), com composição nutricional adequada para manutenção de roedores adultos (AIN-93): a) controle (AIN-93), conforme (Tabela 1), e b) suplementada (AIN-93S): acréscimo de ACR (leucina, isoleucina e valina) em quantidades 50% maiores do que o estipulado pela AIN-93. Posteriormente, um aminograma das rações (Tabela 2) foi realizado para verificar o teor aminoacídico da ração. Os animais foram submetidos às rações experimentais durante 6 semanas, com oferta de água e ração *ad libitum*. O monitoramento do peso e consumo foi realizado 3 vezes por semana.

**Tabela 1 Estimativa mínima da composição dos nutrientes da ração para manutenção de roedores adultos, conforme AIN-93M\***

Nutriente	AIN-93M (g/kg dieta)
Amido de milho	465,7
Caseína (>85% proteína)	140,0
Amido de milho dextrinizado	155,5
Sacarose	100,0
Óleo de soja (sem aditivos)	40,0
Fibra	50,0
Mix mineral	35,0
Mix vitaminas	10,0

\*Adaptado de REEVES et al. (1993)

**Tabela 2 Resultado do aminograma realizado com as rações (AIN-93M e AIN-93MS) e composição mínima de aminoácidos descrita na dieta\***

Aminoácido	AIN-93M <sup>1</sup> (%)	AIN-93M <sup>2</sup> (%)	AIN-93MS <sup>2</sup> (%)
Cistéico	1,91	0,52	1,21
Aspártico	6,40	7,89	6,64
Treonina	3,74	3,60	3,07
Serina	5,33	4,50	4,01
Glutâmico	20,27	21,82	19,02
Prolina	11,37	12,47	12,17
Glicina	1,83	1,66	1,44
Alanina	2,62	2,82	2,46
Metionina	2,62	3,84	3,71
Tirosina	5,25	2,94	2,49
Fenilalanina	4,93	5,02	4,60
Histidina	2,62	2,50	2,55
Lisina	7,31	7,56	6,88
Triptofano	1,27	nd <sup>3</sup>	nd <sup>3</sup>
Arginina	3,58	3,22	2,37
Valina	5,60	<b>5,91</b>	<b>8,45</b>
Isoleucina	4,69	<b>4,49</b>	<b>7,03</b>
Leucina	8,66	<b>8,25</b>	<b>12,22</b>

<sup>1</sup>Conforme REEVES et al. (1993) e corrigido para 100g pr oteína

<sup>2</sup>Conforme resultados obtidos dos aminogramas das rações pr eparadas

<sup>3</sup>Não determinado

## DETERMINAÇÕES EXPERIMENTAIS

Após a 6<sup>a</sup>. semana de experimento os animais foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado e as frações de soro e plasma congeladas e estocadas, para determinação de glicose, amônia, insulina e triptofano total. As amostras de hipotálamo foram retiradas, pesadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -72°C. A concentração de glicose foi determinada pelo método colorimétrico descrito por TRINDER (1969). A de amônia pelo método colorimétrico (kit: Sigma cat. no. 171-A). A de triptofano plasmático total pelo método fluorimétrico descrito por DENCKLA e DEWEY (1967), posteriormente modificado por BLOXAM e WARREN (1974). A concentração de insulina por radioimunoensaio (kit: Amersham cat. RPA n<sup>o</sup> 547). Por fim, a de serotonina hipotalâmica foi determinada por HPLC com detecção eletroquímica, segundo descrito por RIBEIRO et al. (1993).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dois grupos experimentais codificados como CONT e SUPL tiveram seus parâmetros analíticos comparados através de análise de teste T de Student, adotando-se previamente um valor  $\alpha$  de 0,05 (BOWER, 1997). Variáveis que apresentaram significativo desvio da normalidade, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk's W, foram também analisadas, empregando-se o teste de Mann Whitney U, confirmando os resultados obtidos pelo procedimento paramétrico. Todos os cálculos foram realizados utilizando-se o programa STATISTICA v.6 Statsoft Inc. Tulsa, OK.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ratos, estudos experimentais que utilizam alterações na composição protéica e aminoacídica de rações mostram que os animais respondem com um mecanismo de seleção para tais modificações dietéticas. Os animais evitam tanto dietas deficientes de proteínas/ aminoácidos, como hiperprotéicas, embora permaneça a questão de quão precisamente é regulada esta ingestão entre os extremos experimentais (ANDERSON et al. 1990). Diversos investigadores assinalam que altas concentrações de certos aminoácidos no plasma, por um efeito de desequilíbrio aminoacídico, poderiam afetar também a concentração aminoacídica cerebral, com alterações na síntese de neurotransmissores sinalizadores da saciedade (ex: serotonina) (GIETZEN e MAGRUM, 2001; PETERS e HARPER, 1985; PENG et al., 1972).

Neste estudo, apesar da maior oferta via ração de ACR, o consumo de ração no grupo SUPL não foi significativamente diferente quando comparado ao do grupo CONT, ao longo das seis semanas. Também não ocorreram alterações no ganho e manutenção do peso corporal (Tabela 3). Houve manutenção destes parâmetros, embora o grupo suplementado consumisse em média 65% a mais de ACR (290,5mg/dia). Apesar deste resultado indicar que os animais SUPL não alteraram o padrão de consumo alimentar,

houve alteração significativa na concentração de serotonina cerebral (Tabela 4) quando comparada com a do grupo controle.

**Tabela 3 Parâmetros biométricos dos grupos experimentais após 6 semanas: peso final dos ratos e média do consumo de ração e de aminoácidos de cadeia ramificada (ACR)**

	CONT	SUPL	<i>p</i>
Peso final (g)	303,6 ± 16,4	318,2 ± 27,3	0,19
Consumo de ração (g/dia)	21,8 ± 1,1	22,6 ± 1,3	0,21
Consumo ACR (mg/dia)	446,9 ± 23,0	737,4 ± 42,9	0,01

**Tabela 4 Parâmetros cerebrais (serotonina) e plasmáticos (glicose, amônia, insulina e triptofano) dos grupos experimentais**

	CONT	SUPL	<i>p</i>
Glicose (mg/dL)	103,70 ± 10,80	105,50 ± 6,90	0,69
Amônia (µg/mL)	1,34 ± 0,31	1,33 ± 0,09	0,89
Insulina (ng/mL)	5,60 ± 2,90	4,80 ± 1,60	0,47
Triptofano total (µg/mL)	12,20 ± 2,30	10,40 ± 2,70	0,30
Serotonina hipotalâmica (ng/100mg)	9,80 ± 1,20	7,80 ± 0,8	0,01

A suplementação com ACR foi bem aceita pelo grupo SUPL e não ocorreram diferenças significativas na concentração de glicose, amônia, insulina e triptofano total (Tabela 4) quando comparadas com a do grupo controle. A hiperamonemia é um efeito relatado em diversos estudos, tanto em humanos como em animais, devido à suplementação protéica e principalmente com ACR (BANISTER e CAMERON, 1990; BANISTER et al., 1985); porém, este efeito não foi observado no grupo SUPL.

Não foram observadas também diferenças na concentração de insulina no grupo SUPL após 6 semanas de experimento. O aumento da concentração de insulina plasmática é responsável pela maior produção de serotonina cerebral (PAN et al., 1982). Este efeito seria devido à maior captação periférica dos AN competidores e, conseqüentemente, maior passagem de triptofano através da barreira hematoencefálica, com conseqüente aumento na síntese de serotonina (LYONS e TRUSWELL, 1988).

Não houve diferença significativa entre a concentração plasmática de triptofano total do grupo controle quando comparado a do grupo suplementado. Este fato era esperado, já que os animais foram alimentados com dieta normal (controle e suplementada),

com concentrações iguais de triptofano. CHAOULOFF (1993) assinala que alguns autores consideram a parcela livre do triptofano como um fator determinante para a concentração do triptofano cerebral, enquanto outros consideram o triptofano total (parcela livre mais a ligada à albumina).

Neste estudo pode-se supor que a menor concentração hipotalâmica de serotonina poderia ser possivelmente atribuída ao mecanismo de competição aminoacídica plasmática, através da barreira hematoencefálica entre o triptofano e os ACR. A suplementação com ACR aumentaria a competição pela barreira hematoencefálica do triptofano livre e, assim haveria menor captação e síntese de serotonina. No presente estudo não se determinou a concentração de triptofano no cérebro, nem a concentração dos ACR no líquido cefalorraquidiano e, nem no tecido nervoso, fato que sem dúvida, limita esta discussão. No entanto, optamos por medida direta do neurotransmissor serotonina no cérebro. Dados de outros autores assinalam também que a síntese de serotonina cerebral é modulada pela concentração plasmática do aminoácido essencial triptofano.

A pesquisa psicológica e nutricional atual sugere a favor da existência de uma correlação entre serotonina e uma série de alterações comportamentais e nutricionais. Por razões éticas e práticas, os métodos utilizados nas pesquisas em humanos são indiretos, nos quais um dos parâmetros é o monitoramento da concentração de triptofano total (TRP/ $\Sigma$ AN). Neste experimento, observou-se que as concentrações de serotonina cerebral podem ser alteradas (redução de 20,4%) via suplementação com 50% de ACR, sem que haja alterações nos níveis de triptofano total plasmático e dietético. Em humanos, para se produzir uma alteração na função serotoninérgica, via redução do triptofano plasmático, é necessária a retirada total do triptofano dietético. Contudo, a redução não é tão significativa (BELL, 2001). Ainda há a técnica da depleção de triptofano, que alia a retirada dietética do triptofano e uma oferta dos AN competidores. Neste estudo com animais, utilizou-se uma abordagem alternativa para menor captação cerebral de triptofano: oferta de dieta balanceada e suplementação de ACR. Tal abordagem indica que mesmo sem a retirada total do triptofano dietético, pode-se produzir uma redução de serotonina cerebral decorrente de uma suplementação de ACR.

## CONCLUSÃO

No presente estudo, utilizando ratos Wistar, avaliou-se diretamente no hipotálamo a concentração de serotonina. Os resultados mostraram que, mesmo com a oferta de dieta balanceada, porém com acréscimo de 50% de ACR (leucina, isoleucina e valina), houve uma redução significativa da síntese de serotonina nos animais suplementados. Extrapolando esses resultados para seres humanos, pode-se sugerir que dietas hipocalóricas, e, principalmente hiperprotéicas, não seriam aconselháveis sem um acompanhamento criterioso das alterações comportamentais. Finalmente, verifica-se que o monitoramento das alterações da serotonina empregando apenas a avaliação do triptofano total plasmático pode ser inadequado.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- ANDERSON, A.A.; TEWS, J.K.; HARPER, A.E. Dietary branched-chain amino acids and protein selection by rats. *J. Nutr.* v.120, p.52-63, 1990.
- BANISTER, E.W.; CAMERON, B.J.C. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. *Int. J. Sports Med.* v.11, p.S129-S142, 1990.
- BANISTER, E.W.; RAJENDRA, W.; MUTCH, B.J.C. Ammonia as an indicator of exercise stress: implications of recent findings to sports medicine. *Sports Med.* v.2, p.34-46, 1985.
- BELL, C.; ABRAMS, J.; NUTT, D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *British J. Psych.* v.178, p.399-405, 2001.
- BLUNDELL, J.E. Serotonin and the biology of feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* v.55, p.S155-S159, 1992.
- BLOXAM, D.L.; WARREN, W.H. Error in the determination of tryptophan by the Method of Denckla and Dewey. A revised procedure. *Anal. Biochem.* v.60, p.621-625, 1974.
- BOWER, J. Statistics for food science –IV : two-sample tests. *Nutr. Food Sci.*, v.1, p.39:43, 1997.
- CHAOULOFF, F. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Rev.* v.18, p.1-32, 1993.
- CUNLIFFE, A.; OBEID, O.A.; POWELL TUCK, J. Post-prandial changes in measures of fatigue: effect of a mixed or a pure carbohydrate or pure fat meal. *Eur. J. Clin. Nutr.* v.51, p.831-838, 1997.
- \_\_\_\_\_. A placebo controlled investigation of the effects of tryptophan or placebo on subjective and objective measures of fatigue. *Eur. J. Clin. Nutr.* v.52, p.425-430, 1998.
- DENCKLA, W.D.; DEWEY, H.K. The determination of tryptophan in plasma, liver and urine. *J. Lab. Clin. Med.* v.69, p. 160-169, 1967.
- FERNSTROM, J.D.; WURTMAN, R.J. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science.* v.178, p.414-416, 1972.
- GIETZEN, D.W.; MAGRUM, L.J. Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched-chain amino acid deficiency. *J. Nutr.* v. 131, p.851S-855S, 2001.
- LYONS, P.M.; TRUSWELL, A.S. Serotonin precursor influenced by type of carbohydrate meal in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* v.47, p.433-439, 1988.
- MEEUSEN, R.; DE MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med.* v.20, p. 160-188, 1995.
- PAN, R.M.; MAURON, C.; GLAESER, B.; WURTMAN, R.J. Effect of various oral glucose doses on plasma neutral amino acid levels. *Metabolism.* v.31, p.937-943, 1982.
- PARDRIDGE, W.M.; CHOI, T.B. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *Federation Proc.* v.45, p.2073-2078, 1986.
- PENG, Y.; TEWS, J.; HARPER, A.E. Amino acid imbalance, protein intake and changes in rat brain and plasma amino acids. *Am. J. Physiol.* v.222, p.314-321, 1972.
- PETERS, J.C.; HARPER, A.E. Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effect of food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J. Nutr.* v.115, p.382-398, 1985.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* v.123, p.1939-1951, 1993.

- RIBEIRO, E.B.; BETTIKER, R.L.; BOGDANOV, M.; WURTMAN, R.J. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res.* v.621, p.311-318, 1993.
- ROSSI, L.; TIRAPÉGUI, J. Aspectos atuais sobre o exercício físico, fadiga e nutrição. *Rev. Paul. Educ. Fís.* v.13, n.1, p.67-82, 1999.
- TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J. Clin. Phatol.* v.22, p.246, 1969.
- WURTMAN, R.J.; FERNSTROM, J.F. Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* v.28, p.638-647, 1975.

Recebido para publicação em 23/5/02.

Aprovado em 5/11/03.