

# Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro<sup>1</sup>

## *Effects of conjugated linoleic acid on animal metabolism: advances in research and perspectives for the future*

Lilia Ferreira SANTOS-ZAGO<sup>2,3</sup>

Adriana Prais BOTELHO<sup>2</sup>

Admar Costa de OLIVEIRA<sup>4</sup>

### RESUMO

Realizou-se uma revisão sistemática, sem restrição de data, sobre os efeitos fisiológicos do ácido linoléico conjugado sobre a regressão da carcinogênese, o estresse oxidativo, o metabolismo de lípidos e glicose e a alteração da composição corporal. Objetivando estabelecer o aspecto histórico do avanço da pesquisa em ácido linoléico conjugado, consideraram-se artigos originais resultantes de trabalhos realizados com animais, com cultura de células e com humanos. Quanto às pesquisas sobre o efeito anticarcinogênico do ácido linoléico conjugado foram encontradas inúmeras evidências a esse respeito, especialmente na regressão dos tumores mamários e de cólon, induzida por ambos os isômeros os quais agem de maneiras distintas. Os pesquisadores se empenham em reinvestigar as propriedades antioxidantes do ácido linoléico conjugado. Embora tenham sido investigadas as propriedades antioxidantes, tem-se identificado efeito pró-oxidante, levando ao estresse oxidativo em humanos. Foram poucos os estudos que demonstraram efeito positivo significativo do ácido linoléico conjugado sobre o metabolismo dos lípidos e da glicose e sobre a redução da gordura corporal, especialmente em humanos. Estudos sobre efeitos adversos foram também identificados. Há fortes indícios de que a ação deste ácido graxo conjugado sobre uma classe de fatores de transcrição - os receptores ativados por proliferadores de peroxissomo - e sobre a conseqüente modulação da expressão gênica, possa ser a explicação fundamental dos efeitos fisiológicos. Embora incipientes, os mais recentes estudos reforçam o conceito da nutrigenômica, ou seja, a modulação da expressão gênica induzida por

<sup>1</sup> Artigo elaborado a partir do Projeto de Pesquisa intitulado "A suplementação com ácido linoléico conjugado e o perfil lipídico, composição corporal e peroxidação lipídica em ratos"; financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp (Processo 2003/07648-4) e desenvolvido no Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Programa de Doutorado em Alimentos e Nutrição. R. Monteiro Lobato, 80, Cidade Universitária, 13083-862, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: L.F. SANTOS-ZAGO. E-mail: <lzago@fea.unicamp.br>.

<sup>3</sup> Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Centro de Ciências da Vida, Faculdade de Nutrição. Campinas, SP, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição. Campinas, SP, Brasil.

compostos presentes na alimentação humana. O cenário atual estimula a comunidade científica a buscar um consenso sobre os efeitos do ácido linoléico conjugado em humanos, já que este está presente naturalmente em alguns alimentos, que, quando consumidos em quantidades adequadas e de forma freqüente, poderiam atuar como coadjuvantes na prevenção e no controle de inúmeras doenças crônicas.

**Termos de indexação:** Ácido linoléico. Composição corporal. Estresse oxidativo. Neoplasias. Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo.

## ABSTRACT

*This systematic review without date restrictions is about the physiological effects of conjugated linoleic acid on regression of carcinogenesis, oxidative stress, glucose and lipid metabolism and change in body composition. The objective was to establish the historical aspect of research advances regarding conjugated linoleic acid, considering original articles reporting work on animals, cell cultures and humans. Regarding the researches on the anticarcinogenic effect of conjugated linoleic acid, innumerous evidences were found in this respect, especially in the regression of mammary and colon tumors induced by both isomers which act distinctively. The researchers devoted considerable effort to reinvestigate the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. Although the antioxidant properties have been investigated, pro-oxidant effect has been identified leading to oxidative stress in humans. Few studies demonstrated significant beneficial effects of conjugated linoleic acid on the metabolism of lipids and glucose and on the reduction of body fat, especially in humans. Studies with adverse effects were also identified. There is strong indication that the action of this conjugated fatty acid on a class of transition factors - the peroxisome proliferator-activated receptor - and on the consequent modulation of gene expression can be the fundamental explanation of its physiological effects. The most recent studies reinforce the nutrigenomic concept, that is, the modulation of gene expression induced by compounds present in the foods consumed by humans. This current scenario stimulates the scientific community to seek a consensus on the effects of conjugated linoleic acid in humans, since it is naturally found in some foods; when these foods are consumed regularly and in appropriate amounts, they could help prevent and control innumerous chronic diseases.*

**Indexing terms:** Linoleic acid. Body composition. Oxidative stress. Neoplasms. Peroxisome proliferators activated receptors.

## INTRODUÇÃO

Desde o seu descobrimento, no final da década de 70, o ácido linoléico conjugado (CLA) vem sendo estudado de forma constante e exaustiva quanto às suas propriedades benéficas à saúde, em especial a redução da gordura corporal, o que o torna um forte coadjuvante no controle das doenças crônicas não transmissíveis. O CLA corresponde a uma mistura de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas<sup>1</sup>.

As pesquisas com CLA têm afirmado sua ação como um agente redutor de gordura corporal<sup>2-4</sup>. Resultados anteriores obtidos por este grupo de pesquisa confirmam estas evidências. Quando ratos Wistar foram suplementados com

2% de CLA sobre o consumo diário de dieta, estes apresentaram 18% de redução da massa gorda, tanto aos 21 quanto aos 42 dias de tratamento<sup>5</sup>.

Os possíveis mecanismos de ação pelos quais o CLA é capaz de alterar a composição corporal envolvem mudanças metabólicas que propiciam, concomitantemente, a diminuição da lipogênese e a potencialização da lipólise<sup>4</sup>. Dessa maneira, alguns pesquisadores têm avaliado a ação da suplementação com CLA sobre o perfil hormonal e a atividade das enzimas envolvidas no processo de oxidação e síntese de triacilgliceróis, de forma a fornecer mais subsídios para o completo esclarecimento dessas propriedades biológicas.

Ao final da década de 80 e início da década de 90, Ha et al.<sup>1</sup> e Ha et al.<sup>6</sup> relataram e discu-

tiram a propriedade antioxidante do CLA. Nos últimos anos essa propriedade tem sido reinvestigada para melhor entender o fato de que um ácido graxo com duplas ligações conjugadas exerce efeito antioxidante. O CLA é um dieno conjugado, ou seja, um dos primeiros produtos da oxidação lipídica, bastante susceptível as reações de autooxidação, o que o torna um potencial agente pró-oxidante em sistemas biológicos. No entanto, por mecanismos ainda obscuros, parece que o CLA apresenta certa estabilidade à autooxidação, mesmo sem proteção antioxidante. Ao considerar esta hipótese são muitos os estudos que visam a identificar e, sobretudo, compreender a influência do CLA sobre o processo de oxidação dos lípides biológicos, por meio da quantificação dos mais diversos indicadores<sup>7-14</sup>. Nos últimos três anos de pesquisa com CLA, este grupo chegou à conclusão de que a suplementação com este composto influencia o processo de oxidação dos lípides biológicos de ratos. Contudo, ainda faltam subsídios para o completo entendimento sobre a atuação do CLA como antioxidante e/ou pró-oxidante, visto que os resultados permitiram analisar apenas estas duas possibilidades. Frente a esse paradoxo, até agora, os resultados indicam que a atividade antioxidante ou pró-oxidante do CLA é dependente do tipo e da dose do suplemento, assim como do indicador utilizado, incluindo o local (tecido ou fluído corporal) e a metodologia de determinação do mesmo. Tal situação deixa perspectivas de continuidade das investigações para preencher essas lacunas e elucidar a influência do CLA sobre o processo de autooxidação lipídica.

Um efeito do consumo de CLA que tem merecido atenção é o de influenciar a sensibilidade à insulina, como decorrência de sua ação sobre o metabolismo de glicose e lipídios. Isso tem sido relatado por diversos pesquisadores não somente em modelos experimentais, como ratos, camundongos e hamsters, mas também em humanos<sup>15,16</sup>. O fato é que os resultados são controversos e ainda não há um consenso sobre a real atuação do CLA sobre esse processo, bem como sobre os mecanismos de ação pelos quais ele atua. Existem

evidências de que a suplementação com CLA atue no aumento da sensibilidade à insulina<sup>17-19</sup>. No entanto, alguns autores relatam que ele não altera o perfil de insulinemia ou que promove, até mesmo, ação hiperinsulinêmica<sup>20-23</sup>. É importante destacar que os efeitos relacionados ao perfil insulínico são isômero dependentes. Os resultados obtidos pelos autores citados anteriormente mostram que o isômero *cis*-9 *trans*-11 promove aumento da sensibilidade à insulina, já o isômero *trans*-10 *cis*-12 é o responsável pelos possíveis efeitos hiperinsulinêmicos.

O objetivo deste trabalho foi revisar a literatura, de forma exaustiva e sistemática, sobre a origem e as propriedades fisiológicas do CLA que estão relacionadas com a alteração da composição corporal, com o metabolismo de glicose e lipídios, com a susceptibilidade ao estresse oxidativo e com o desenvolvimento do câncer.

## MÉTODOS

---

Foi realizada uma revisão da literatura de forma exaustiva e sistemática, sem restrição de data e somente com fontes primárias indexadas nas bases de dados SciELO, PubMed, Medline e ISI Web of Knowledge. As palavras-chave utilizadas foram "CLA and body fat", "CLA and lipid profile", "CLA and lipid peroxidation", "glucose metabolism and CLA", "lipid metabolism and CLA", "CLA and oxidative stress", "CLA and câncer" e "CLA and peroxisome proliferator activated receptors". Para estabelecer os aspectos históricos do tema em questão, foram incluídos ensaios *in vivo*, realizados com animais e humanos, e ensaios *in vitro*, realizados com cultura de células de animais e de humanos, independentemente dos resultados terem sido positivos ou negativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Foram incluídos 140 artigos originais, os quais tiveram como objetivo estudar a origem e

consumo de CLA e seus respectivos efeitos sobre a carcinogênese, a oxidação dos lípidos biológicos, o metabolismo dos lípidos e glicose e a composição corporal. Foram incluídos também estudos que, indiretamente, estavam relacionados com a identificação e a explicação dos efeitos em questão. Além dos artigos originais foram incluídas 4 comunicações em Eventos Científicos específicos da área e 1 referência da *National Academy of Sciences* a respeito das necessidades e recomendações para ácidos graxos. Os trabalhos selecionados serão discutidos a seguir, considerando a ordem cronológica dos mesmos e divididos em cinco seções: “origem e consumo de CLA”, “CLA e câncer”, “CLA e estresse oxidativo”, “CLA, Metabolismo de Glicose e Lipídios e Composição Corporal” e “CLA e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo”.

## ORIGEM E CONSUMO DO CLA

O CLA pode ser originado no rúmen, por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta, e também pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans*-11, por ação da estearoil - CoA dessaturase (SCD)<sup>24</sup>. Em ruminantes, durante o processo de biohidrogenação do ácido linoléico, o isômero *cis*-9, *trans*-11 é o primeiro intermediário formado pelas bactérias ruminais. Dentre as bactérias existentes a *Butyrivibrio fibrosolvens* é a mais conhecida<sup>25</sup>. Porém, várias outras espécies possuem lípases capazes de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos e, portanto, produzir CLA, entre elas a *Lactobacillus casei* e a *Lactobacillus acidophilus*<sup>26</sup>. A isomerização inicial é catalisada pela  $\Delta^{12}$  *cis*,  $\Delta^{11}$  *trans*-isomerase que, com maior frequência, é proveniente da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrosolvens*. Daí se origina o *cis*-9, *trans*-11 que, após a saturação da dupla ligação *cis*-9 pela ação de uma redutase, forma o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11)<sup>25</sup>. Normalmente a biohidrogenação acontece de forma completa, porém alguns produtos intermediários, como o *cis*-9, *trans*-11 C18:2, podem atravessar o rúmen, se

mover pela corrente sanguínea, ser absorvidos pela glândula mamária e incorporados à gordura do leite. Existem diversos fatores que podem influenciar a biohidrogenação no rúmen e, dessa maneira, alterar a quantidade e a composição dos ácidos graxos insaturados disponíveis para a deposição no tecido adiposo ou para secreção na gordura do leite. As condições de alimentação, assim como, o tipo e a concentração dos ácidos graxos presentes, determinam quais bactérias ruminais serão predominantes no rúmen e, conseqüentemente, o pH que, para favorecer a produção de CLA, deve ser superior a 6,025,26. A síntese nos tecidos tem início quando o ácido graxo C18:1 sofre dessaturação pela enzima  $\Delta^9$  dessaturase, presente na glândula mamária e no tecido adiposo<sup>27</sup>.

Embora pequenas concentrações de CLA possam ser encontradas nos tecidos humanos, a origem deste composto ainda não está elucidada. Acredita-se que a formação de CLA nos humanos seja decorrente da autooxidação de ácidos graxos insaturados provenientes da dieta<sup>14</sup>.

O CLA também pode ser sintetizado quimicamente, a partir do ácido linoléico, originando produtos com diferentes composições dos seus isômeros. Esse processo pode variar em decorrência da fonte de ácido linoléico utilizada, assim como das condições de isomerização<sup>28</sup>.

Pelo fato de o CLA ser originado por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais, e também via  $\Delta^9$  dessaturase na glândula mamária e no tecido adiposo, os alimentos derivados de ruminantes, particularmente os produtos lácteos, são as maiores fontes de CLA<sup>26</sup>. Dentre os isômeros de CLA, o *cis*-9, *trans*-11 ocorre em maiores concentrações nos alimentos. Isso pode ser explicado pelo fato de que, nos ruminantes, as dessaturações somente podem ocorrer até o carbono 9, devido à ausência das dessaturases  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$ , encontradas somente nos vegetais. Isso se torna ainda mais importante, ao lembrar que a síntese endógena, dependente da ação da  $\Delta^9$  dessaturase, é a principal via de formação do CLA<sup>29</sup>. Também vale

ressaltar que, assim como todos os ácidos graxos poliinsaturados, o CLA tende a ser menos direcionado para tecidos de depósito e mais para fosfolípidos de membranas<sup>30</sup>. No caso dos isômeros de CLA, o *cis-9, trans-11* é menos metabolizado e, conseqüentemente, mais presente nos alimentos. O conteúdo de CLA em leite e derivados e na carne bovina é cerca de 5 e 4mg/g de gordura, respectivamente, sendo o isômero *cis-9, trans-11* o responsável por mais de 80% desse conteúdo<sup>31</sup>.

Quanto ao consumo de CLA pela população, este é um tanto quanto difícil de estimar, mas pesquisas têm sido realizadas com esse intuito<sup>32-34</sup>. Em estudo realizado por Ritzenthaler et al.<sup>32</sup>, 51 homens e 51 mulheres foram acompanhados durante um ano, e suas ingestões alimentares medidas por meio de pesagem direta dos alimentos. O consumo de CLA total foi de 212 e 151mg/dia, e do isômero *cis-9, trans-11* foi de 193 e 140mg/dia para homens e mulheres, respectivamente. Fritsche & Steinhart<sup>34</sup>, na Alemanha, utilizando-se de uma pesquisa de consumo nacional, estimaram um consumo de 430 e 350mg de *cis-9, trans-11*/dia para homens e mulheres, respectivamente. Em pesquisa realizada com idosos suecos Jiang et al.<sup>33</sup> encontraram consumo de CLA de 160mg/dia. Segundo a *United States National Academy of Science*, baseado na atitude de compra de consumidores canadenses, o consumo de CLA foi de 332 e 295mg/dia para homens e mulheres, respectivamente<sup>35</sup>.

## CLA e câncer

A mais antiga das propriedades fisiológicas do CLA é a que está relacionada com a proteção contra a carcinogênese. Na verdade, foi em experimentos de identificação de substâncias anticarcinogênicas em carnes grelhadas que o CLA foi descoberto. Levando em consideração a relação entre os ácidos graxos provenientes da dieta e a carcinogênese. Ha et al.<sup>1,36</sup> isolaram substâncias anticarcinogênicas de extrato de carnes grelhadas, identificadas como CLA. A partir de então surgiram estudos objetivando identificar como o CLA atua

na carcinogênese. Os primeiros estudos de investigação das propriedades anticarcinogênicas do CLA datam do início da década de 90. Ha et al.<sup>6</sup> estudaram a ação anticarcinogênica deste composto em camundongos submetidos à indução de câncer de estômago por benzopireno, e encontraram que os animais tratados com CLA apresentaram metade da quantidade de neoplasmas, quando comparados com os controles. É importante ressaltar que apenas o isômero *cis-9, trans-11* foi encontrado nos fosfolípidos do estômago dos camundongos, demonstrando que este seria o isômero responsável pela ação anticarcinogênica. O mecanismo de ação estaria relacionado com a propriedade antioxidante do composto, em especial do isômero *cis-9, trans-11*. Tal isômero inibiria reações do tipo Fenton e, conseqüentemente, os danos causados pelos radicais hidroxila nas membranas celulares, diretamente relacionados com o desenvolvimento de diversos processos patológicos, inclusive aqueles de iniciação e promoção de alguns tipos de câncer.

Foram os estudos sobre os efeitos do CLA nos tumores mamários que abriram as portas para a busca do entendimento dos mecanismos de ação, das concentrações ótimas e do tempo de exposição para que o efeito benéfico fosse atingido. Em 1991, Ip et al.<sup>37</sup> estudaram a relação entre o consumo de CLA e o desenvolvimento de tumores mamários induzidos por dimetilbenzo-antraceno em fêmeas de ratos. Os autores demonstraram que houve efeito protetor, atribuído ao isômero *cis-9, trans-11*, e dose dependente. A princípio, a propriedade antioxidante do CLA seria a responsável pela ação anticarcinogênica. Entretanto, a ação antioxidante máxima aconteceu quando o CLA foi administrado na concentração de 0,25 % (em relação ao peso da dieta), enquanto que a máxima inibição do tumor se deu quando foi administrado na concentração de 1% (em relação ao peso da dieta), demonstrando que outros mecanismos estariam envolvidos na ação anticarcinogênica do CLA.

Até então, as pesquisas mostravam que o CLA reduzia o câncer mamário, no entanto, os

mecanismos de ação pelos quais os diferentes isômeros de CLA levavam a essa redução ainda estavam obscuros. Os trabalhos apontavam que o isômero *cis*-9, *trans*-11 parecia ser o grande responsável pela ação. Com o avanço dos estudos foi possível entender que ambos os isômeros, *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12, exercem efeito protetor contra o tumor mamário por diferentes mecanismos, os quais estão relacionados com promotores do crescimento celular e angiogênese<sup>38,39</sup>.

Além da inibição de fatores de crescimento e da angiogênese, o CLA também promove a redução do tumor mamário, devido à sua ação anti-estrogênica e, neste caso, o isômero responsável é o *cis*-9, *trans*-11. Tanmahasamut et al.<sup>40</sup> apontaram uma das primeiras evidências dos mecanismos moleculares de ação do CLA. Os autores demonstraram que o CLA reduz tanto mRNA, quanto a concentração do receptor de estrógeno, reduzindo a atividade de ligação do mesmo ao seu respectivo elemento responsivo no DNA. Posteriormente, foi demonstrado que o CLA promove a redução da ligação do receptor de estrógeno ao seu elemento responsivo no DNA, por meio da fosforilação do receptor, mediada pela estimulação da fosfatase 2A (PP2A)<sup>41</sup>. Os estudos da biologia molecular contribuíram bastante para a identificação de inúmeros mecanismos que explicam as propriedades anticarcinogênicas dos isômeros de CLA. São muitos os mecanismos já identificados, relacionados com a redução da proliferação celular, por meio da interrupção de fases do ciclo celular, além de inibição e ativação da transcrição de genes que codificam proteínas anti-apoptóticas (Bcl-X<sub>L</sub>) e pró-apoptóticas (caspases iniciadoras e executoras, p.53 e Bak)<sup>42,43</sup>.

Frente à importância de produtos da oxidação dos lípidos pela via enzimática na progressão da tumorigênese mamária, estudos objetivando avaliar a influência do CLA sobre esta via de oxidação lipídica, demonstram que, tanto o isômero *trans*-10, *cis*-12, quanto o *cis*-9, *trans*-11 reduzem a produção de 5-hidroxiicosa-tetraenóico. Provavelmente isso se dá por competição com o ácido araquidônico e inibição da

proteína ativadora de 5-lipoxigenase<sup>44</sup>, além de redução da transcrição de ciclooxigenase-2<sup>45</sup>.

O ato de grelhar carnes resulta na produção de uma gama de aminas heterocíclicas com propriedades carcinogênicas, como, por exemplo, a 2-amino 3-metilimidazol 4,5-*f*-quinolina (IQ), a qual está relacionada com o desenvolvimento de tumores no fígado, na pele, no intestino delgado e no cólon, em várias espécies<sup>46</sup>. Tanto IQ quanto CLA estão presentes nas carnes grelhadas e, por isso, o câncer de cólon também é grande alvo de pesquisas no que diz respeito aos efeitos anticarcinogênicos do CLA. Em 1995, Liew et al.<sup>46</sup> demonstraram efeito protetor do CLA contra a formação de adutos de DNA induzidos por IQ, e também de criptas aberrantes no cólon de ratos F344, na fase inicial da carcinogênese. Os autores discutem sobre o mecanismo que explica o efeito protetor, e concluem que este tem relação com a inibição pelo CLA de enzimas que ativam o IQ, como a citocromo P450 e a prostaglandina H sintase. A partir de então, vários foram os estudos para verificar a relação entre consumo de CLA e regressão de câncer de cólon. Considerando a influência da peroxidação lipídica sobre o câncer, associada ao possível efeito antioxidante do CLA, O'Shea et al.<sup>47</sup> estudaram a relação entre enzimas antioxidantes e supressão do crescimento de células de câncer de cólon que foram expostas ao CLA. Segundo os resultados, a exposição das células ao CLA durante 12 dias aumentou a peroxidação lipídica e não protegeu as células dos efeitos tóxicos dos produtos resultantes. Vale chamar atenção para a discrepância dos achados no que diz respeito ao efeito anticarcinogênico do CLA, explicado por sua propriedade antioxidante. É claro que é imprescindível considerar a concentração de CLA administrada, visto que este pode apresentar mudanças em seus efeitos segundo a dose, como foi recentemente observado por Flintoff-Dye & Omaye<sup>7</sup>. O trabalho de O'Shea et al.<sup>47</sup> permite a discussão a respeito de outros mecanismos de ação, que não seu efeito antioxidante, como responsáveis pelas propriedades anticarcinogênicas do CLA. Os autores observaram

que, embora a peroxidação lipídica tivesse aumentado, houve redução do número de células cancerosas.

As pesquisas sobre o efeito protetor do CLA contra o câncer de cólon foram acontecendo de forma constante, e mecanismos moleculares de ação foram identificados. Em 2001, Park et al.<sup>48</sup>, estudando câncer de cólon induzido por dimetilhidrazina em ratos, demonstraram que a redução da incidência do câncer está relacionada com o aumento do índice apoptótico. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o aumento do índice apoptótico estaria relacionado, em parte, com a redução de prostaglandinas E2, acompanhada do aumento da razão das proteínas pró-apoptóticas Bax/Bcl-2, como foi observado pelos autores<sup>49</sup>. Lim et al.<sup>50</sup> complementam os achados supracitados, demonstrando que a administração de concentrações fisiológicas de CLA interrompeu o crescimento das células de câncer de cólon, já que houve um aumento significativo de células na fase G1 do ciclo celular. Esse aumento foi acompanhado da indução de p21, proteína que regula negativamente promotores de crescimento celular como antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e das ciclinas A, D1 e E, os quais estavam reduzidos após tratamento com CLA.

No início dos estudos sobre as propriedades anticarcinogênicas do CLA discutiu-se a hipótese de que o isômero *cis*-9, *trans*-11 e, não o *trans*-10, *cis*-12, seria o responsável pelas mesmas, possivelmente, por sua ação antioxidante<sup>6,37</sup>. Os resultados referentes ao efeito protetor de CLA contra o câncer de cólon, discutido acima, são decorrentes da administração do conjunto de isômeros de CLA, e não de um isômero em especial. Portanto, não há como saber se a ação protetora é isômero dependente. Cho et al.<sup>51</sup>, que já tinham detectado, em experimentos *in vitro*, que o isômero *trans*-10, *cis*-12 era o responsável pela inibição do crescimento de células de câncer de cólon, trataram células de câncer de cólon com diferentes concentrações de isômeros independentes de CLA, com o objetivo de identificar o

efeito de cada isômero sobre o ciclo celular e as proteínas regulatórias do mesmo. Os autores demonstraram que apenas o isômero *trans*-10, *cis*-12 teve efeito inibitório sobre o crescimento celular, e que esse efeito é decorrente da indução de p21. Corroborando esses resultados, Lee et al.<sup>52</sup> também comprovaram que o isômero *trans*-10, *cis*-12 reprime a proliferação celular no câncer colorretal, devido à ativação do fator de transcrição 3 (ATF-3) e ao aumento da expressão do gene pró-apoptótico NAG-1. Ao considerar o exposto anteriormente, é possível especular que os efeitos protetores do CLA contra o câncer de cólon são atribuídos ao isômero *trans*-10, *cis*-12. Não estão, desse modo, relacionados com propriedades antioxidantes do mesmo e, sim, com a indução de proteínas apoptóticas, bem como com a inibição de promotores do crescimento celular.

Os alimentos com maiores quantidades de CLA possuem também grandes quantidades de gordura, cujo perfil quantitativo e qualitativo de ácidos graxos pode interferir na atividade anticarcinogênica do mesmo. Visando a investigar a influência da quantidade e da composição dos lipídeos dietéticos sobre o efeito protetor do CLA contra tumor mamário induzido por dimetilbenzo-antraceno, Ip et al.<sup>53</sup> suplementaram ratos fêmeos com misturas de óleos vegetais, em diferentes concentrações, que variaram de 10% a 20%, acrescidas ou não de 1% de CLA. Segundo os autores, a ação anticarcinogênica do CLA é independente tanto da quantidade quanto da qualidade dos lipídeos dietéticos. Mas, não foi a esta conclusão a que Hubbard et al.<sup>54</sup> chegaram, em trabalho realizado também com o objetivo de avaliar a influência da gordura dietética sobre os efeitos anticarcinogênicos do CLA. A substituição de metade da quantidade da mistura de óleos vegetais por banha regrediu significativamente a metástase do tumor mamário em camundongos, além de reduzir a concentração de CLA necessária para atingir o efeito anticarcinogênico em 50%. Foi observado ainda que a eficácia do CLA reduz à medida que aumenta o consumo de ácido linoléico. Ao considerar tal fato é importante chamar

a atenção para o consumo excessivo de óleos vegetais ricos em ácido linoléico, como o óleo de milho, por exemplo, o qual, muitas vezes, recebe a preferência dos consumidores devido ao apelo nutricional decorrente do seu alto teor de ácidos graxos poliinsaturados.

A maioria dos estudos sobre as propriedades anticarcinogênicas do CLA diz respeito ao câncer mamário e de cólon. No entanto, este composto também possui efeito inibitório sobre o crescimento de outros tipos de células cancerígenas, como as leucêmicas, as de câncer de próstata e gástrico. Tanto o isômero *trans*-10, *cis*-12 quanto o *cis*-9, *trans*-11, por mecanismos distintos, possuem efeito antiproliferativo sobre estes tipos de cânceres, mecanismos estes que envolvem controle do ciclo celular, indução da apoptose e controle do metabolismo do ácido araquidônico<sup>55-59</sup>.

### CLA e estresse oxidativo

O efeito do CLA sobre o processo de autooxidação lipídica tem sido bastante estudado nos últimos anos, com resultados um tanto quanto ambíguos, os quais não permitem ainda conclusões claras a respeito de sua ação antioxidante. A presença de duplas ligações na configuração *trans* em isômeros do CLA contribui para a estabilidade do mesmo à oxidação. Porém, ao levar em consideração o fato de que a conjugação das duplas ligações é um dos primeiros passos da autooxidação lipídica, e que a partir daí se iniciam as irrefreáveis reações em cadeia do processo oxidativo, o CLA poderia atuar como pró-oxidante. O início das pesquisas com CLA foi marcado pela identificação de sua propriedade anticarcinogênica, explicada pela atividade antioxidante, particularmente, do isômero *cis*-9, *trans*-11. A hipótese que explica a ação antioxidante do CLA é baseada na formação de  $\beta$ -hidroxiacroleína, a partir da reação dos radicais hidroxila e peroxila de CLA com o oxigênio. Essa estrutura aldeídica seria a responsável pela ação antioxidante do CLA por meio da formação de quelato com o ferro, inibindo

assim as reações de Fenton e, conseqüentemente, o início da cadeia de reações da autooxidação lipídica. Deve-se ressaltar que a preocupação com a relação entre concentração de CLA e seu respectivo efeito antioxidante já existia, e foi relatada pelos pesquisadores que hipotetizaram o mecanismo de ação antioxidante, que já alertavam que o CLA não apresentava efeito antioxidante em altas concentrações<sup>6</sup>. Um dos primeiros estudos de avaliação das propriedades antioxidantes do CLA foi o de Ip et al.<sup>37</sup> que suplementaram ratos fêmeas Sprague-Dawley com diferentes concentrações de CLA (0,25 a 1,5 %) durante 1 mês. A avaliação da ação antioxidante foi feita por meio da determinação da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e na glândula mamária dos animais. Os autores confirmaram a ação antioxidante do CLA, que não foi diferente em decorrência da concentração. Um fato interessante e, ao mesmo tempo, indagador foi que o CLA atuou como agente antioxidante, sem hipóteses plausíveis para explicar, somente na glândula mamária.

A estabilidade à oxidação do CLA *in vitro* é alvo de pesquisas com conclusões divergentes. Mas, é comum a todos esses estudos o fato de que o CLA é mais estável que outros ácidos graxos poliinsaturados que não tenham ligações do tipo *trans*. Até mesmo dentre os isômeros de CLA, aqueles que são *cis* possuem menor estabilidade em relação aos *trans*. Além disso, esses estudos também mostram que a estabilidade oxidativa do CLA é dependente da esterificação com acilgliceróis, em especial os triacilgliceróis, de forma que a estabilidade é menor quando o CLA está em sua forma livre<sup>60-62</sup>. Sendo assim, é de extrema importância que se leve em consideração a forma como o CLA é administrado nos modelos experimentais. A administração de CLA na forma de ácidos graxos livres ou na forma de triacilgliceróis, certamente, irá desencadear efeitos biológicos diferentes no que diz respeito à oxidação lipídica, embora não seja comum esse tipo de informação na maioria dos trabalhos. No laboratório deste grupo de pesquisa, tem-se demonstrado, em



estudos *in vitro*, que o CLA possui certa estabilidade à autooxidação. Os resultados demonstram que as produções de peróxido e malondialdeído, a partir de CLA, são menores em comparação com ácido linoléico<sup>63</sup>.

Outro aspecto fundamental para avaliar a propriedade antioxidante do CLA é a sua concentração. Nesse sentido, em trabalho recentemente realizado por Flintoff-Dye & Omaye<sup>7</sup> foram avaliadas as propriedades antioxidante e pró-oxidante dos isômeros de CLA *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12, por meio da determinação da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) de amostras de sangue humano. Os resultados obtidos indicaram que ambos os isômeros influenciaram o processo de oxidação lipídica de maneira semelhante. Os autores apontam que o CLA age de forma paradoxal, ou seja, inicialmente como pró-oxidante (em concentrações baixas), depois como antioxidante (em concentrações intermediárias) e, posteriormente pró-oxidante (em concentrações elevadas). Concluem que, de maneira geral, o CLA é um agente pró-oxidante devido à observação do aumento do estresse oxidativo em concentrações baixas, quando se esperaria um efeito antioxidante.

Embora existisse uma hipótese para explicar a ação antioxidante do CLA (ação esta que, *in vitro*, é mais potente que a do  $\alpha$ -tocoferol e similar à do butil hidroxi tolueno - BHT)<sup>6</sup>, o ato de consumir um ácido graxo em seu estágio inicial de autooxidação, como um agente antioxidante, intrigava a comunidade científica. De fato não demorou até surgirem os estudos de reinvestigação das propriedades antioxidantes do CLA. Ainda na década de 90, grupos de pesquisadores apontavam indícios de efeito pró-oxidante do CLA. Isso se daria por meio da quantificação de produtos primários e secundários da autooxidação lipídica, como peróxidos e malondialdeído, respectivamente; de eicosanóides resultantes da oxidação pela via enzimática e não enzimática, como 15-ceto-dihidroPGF<sub>2 $\alpha$</sub>  8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  isoprostana, respectivamente; pela avaliação da atividade

biológica dos sistemas enzimáticos de proteção à oxidação, assim como de reparo aos danos causados por tal processo como, a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD)<sup>12-14</sup>.

Alguns anos após a identificação do efeito antioxidante do CLA estudos com o objetivo de reinvestigar esse efeito começaram a surgir de forma constante. O estudo de van Den Berg et al.<sup>14</sup> foi marcante nesse sentido. Avaliando a ação antioxidante do CLA em comparação com vitamina E e BHT em membranas compostas por 1-palmitoil-2-linoleoil fosfatidilcolina (PLPC), expostas ao estresse oxidativo mediado ou não por íons metálicos, os autores concluíram que o CLA não atuou como antioxidante, mesmo quando as membranas foram expostas ao estresse oxidativo mediado por íons metálicos. Esses achados contradizem a hipótese inicialmente levantada, já descrita anteriormente, sobre a possível formação de quelato entre o isômero *cis*-9, *trans*-11 de CLA e íons metálicos, de forma a inibir reações do tipo Fenton e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Mas, ao final da década de 90, estudos buscando verificar a influência do CLA sobre o sistema enzimático de proteção à oxidação (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) demonstraram que o CLA, em concentrações fisiológicas (5 a 20 ppm), não propicia a oxidação lipídica em hepatócitos normais de ratos e, portanto, não poderia ser considerado como um agente pró-oxidante. Na tentativa de fundamentar tais resultados os autores chegam a discutir que a resistência dos hepatócitos à ação do CLA poderia ser resultante do amplo estado antioxidante dessas células<sup>13</sup>. A partir de então, torna-se cada vez mais difícil o entendimento da influência do CLA sobre a oxidação dos lípidos biológicos, frente aos resultados contraditórios encontrados pelos diversos grupos de pesquisa da área.

A partir do ano 2000 o número de estudos que afirmam que o CLA induz o estresse oxidativo, tanto em roedores quanto em humanos, é bastante significativo. Tais estudos utilizaram diversos

métodos, dos mais tradicionais aos mais modernos, na direção de encontrar um consenso sobre a ação antioxidante ou pró-oxidante do CLA. Já no início desta década, Yamasaki et al.<sup>12</sup>, em estudo realizado com ratos *Sprague Dawley* suplementados com 1% e 2% de CLA, observaram um aumento significativo na concentração hepática de produtos primários e secundários da oxidação lipídica, como os hidroperóxidos de fosfatidilcolina e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), respectivamente, o que levou os autores a afirmar que o CLA é um pró-oxidante. Marcadores biológicos do estresse oxidativos mais sensíveis passaram a ser utilizados nos estudos, os quais se tornaram mais freqüentes em humanos. Exemplo disso são os estudos de Risérus et al.<sup>8</sup>, Smedmam et al.<sup>9</sup>, Basu et al.<sup>11</sup>, Basu et al.<sup>64</sup>, e de Risérus et al.<sup>65</sup>, que encontraram altas concentrações de eicosanóides resultantes da oxidação lipídica pelas vias enzimática (15-ceto-dihidroPGF<sub>2</sub>·) e não enzimática (8-iso-PGF<sub>2α</sub> isoprostana). Tais são os indicadores considerados, atualmente, mais sensíveis para esse fim, tanto no soro quanto na urina dos sujeitos. A indução do estresse oxidativo por ambos os isômeros de CLA, *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 foi uma conclusão unânime dessas pesquisas.

Para intrigar mais ainda a comunidade científica, trabalhos comprovando a atividade antioxidante do CLA ainda são publicados. Recentemente Kim et al.<sup>44</sup> demonstraram que a suplementação com 1,5% de mistura de CLA em ratos *Sprague-Dawley* reduz significativamente a concentração hepática de TBARS, e também a atividade das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase e superóxido dismutase, permitindo concluir que o CLA é um antioxidante. Outro recente achado relevante nesse contexto é o de Arab et al.<sup>66</sup>, que demonstraram, em fibroblastos humanos, que o contato durante 7 dias com o isômero *cis*-9, *trans*-11 de CLA foi o único, em comparação com outros 7 ácidos graxos poliinsaturados, que aumentou de forma significativa a síntese de glutatona sem nenhuma alteração no balanço oxidativo celular. Ao considerar que o

aumento, no sangue ou no tecido, de indicadores de oxidação lipídica leva à conclusão de que o sistema biológico em questão estaria sob estresse oxidativo, o fato de que o CLA induz a síntese de glutatona sem levar à oxidação lipídica é, além de incomum, fundamental para a elucidação da influência do CLA sobre o processo de oxidação dos lípidos biológicos.

Os autores desta revisão têm demonstrado, em estudos realizados com ratos, correlações negativas significantes entre consumo de 2% de misturas comerciais de CLA (contendo 75% dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12, em iguais proporções entre eles), e catalase e malondialdeído séricos, o que permite concluir que o CLA atua como um antioxidante. No entanto, as correlações encontradas entre o consumo de CLA e aumento dos peróxidos hepáticos e 8-iso-PGF<sub>2α</sub> isoprostana plasmática são, ainda que não significantes, positivas, o que leva a aprofundar a investigação sobre o possível efeito pró-oxidante do CLA<sup>67</sup>.

Há que fazer uma ressalva para o fato de que a indução do estresse oxidativo pelo CLA em muitos estudos, especialmente aqueles relacionados com a carcinogênese, é discutida como um dos mecanismos responsáveis pelo efeito antiproliferativo de alguns tipos de cânceres<sup>42,47</sup>. Ao mesmo tempo, é importante lembrar que os efeitos benéficos do CLA, como o aumento da oxidação dos ácidos graxos, também provocam efeitos deletérios. Um desses efeitos é o estresse oxidativo, particularmente em situações em que o organismo está deficiente de agentes que o protegem contra a oxidação, levando ao desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, de forma a favorecer os oxidantes, caracterizando, dessa forma, o estresse oxidativo.

### **CLA, metabolismo de glicose e lipídeos e composição corporal**

Muitos estudos, a serem discutidos adiante, têm demonstrado, em animais e em humanos,

que o CLA influencia o metabolismo energético promovendo alterações significativas no metabolismo dos lipídeos e da glicose, e também na composição corporal. A administração de CLA, sob as mais diversas maneiras e concentrações, parece ser responsável pela melhora do perfil lipídico sanguíneo, pela redução da aterosclerose, pela melhora da resistência à insulina e pela redução da gordura corporal, por mecanismos distintos e de forma diferente em animais e em humanos.

Após a descoberta da atividade antioxidante do CLA, estudos buscando demonstrar os efeitos benéficos deste composto, em situações patológicas relacionadas com o estresse oxidativo, começaram a surgir. Nesse sentido, a relação entre CLA e aterosclerose foi uma das primeiras a ser investigada, visto que, já era conhecido o fato de que a aterosclerose é caracterizada por um processo inflamatório iniciado pela oxidação da lipoproteína de baixa densidade. Lee et al.<sup>68</sup> demonstraram que a administração de 0,5g de CLA por dia, associada a uma dieta hipercolesterolêmica, durante 22 semanas reduziu significativamente a concentração de LDL e colesterol total e a aterosclerose em coelhos. Posteriormente, ainda na década de 90, Deckere et al.<sup>69</sup>, utilizando hamster como modelo experimental, apresentaram resultados que, ao mesmo tempo, complementam e contradizem os anteriores. Os autores encontraram redução não somente de LDL-colesterol, mas também de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), além de um aumento de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-triacilglicerol), quando 1,5% do isômero *trans*-10, *cis*-12 foi administrado durante 8 semanas, associado a uma dieta hipercolesterolêmica. Também contraditoriamente, Munday et al.<sup>70</sup> não observaram redução de aterosclerose em camundongos. Aparentemente os motivos pelos quais os resultados são diferentes é desconhecido. Apesar disso, é importante ressaltar que os modelos experimentais utilizados nos trabalhos supracitados, provavelmente, responderiam de maneira distinta ao CLA, por apresentarem diferentes graus de sensibilidade a modifica-

ções no perfil lipídico da dieta, já que os coelhos são bem mais sensíveis a essas modificações, quando comparados com os hamsters. O panorama atual a respeito dos efeitos benéficos do CLA na redução dos lipídeos sanguíneos e na redução da aterosclerose apresenta resultados positivos em coelhos<sup>71</sup> e alguns em hamsters<sup>72,73</sup>. Em humanos os resultados não são satisfatórios, visto que a maioria dos estudos não demonstra alteração do perfil lipídico<sup>74-76</sup> e, quando isto acontece, essas alterações não são benéficas como, por exemplo, aumento na concentração de lipoproteína<sup>77</sup>, redução de HDL colesterol (principalmente pelo isômero *trans*-10, *cis*-12) e aumento de triacilglicerol<sup>65,78</sup>, além do aumento de LDL colesterol<sup>79</sup>. Destaca-se que os estudos realizados com humanos apresentam as mais diversas populações e amostragens relativamente pequenas contendo a menor 17 indivíduos<sup>74,76</sup> e a maior 180 indivíduos<sup>77</sup>. Os estudos foram constituídos de indivíduos de ambos os sexos, com peso normal, sobrepeso ou obesidade, o que contribui para a diversidade dos resultados.

A resposta aos distintos isômeros de CLA parece não ter sido diferente, embora Tricon et al.<sup>80</sup> tenham encontrado que o isômero *trans*-10, *cis*-12 aumentou em maior proporção a concentração de triacilglicerol e LDL colesterol em homens saudáveis, quando comparado com o isômero *cis*-9, *trans*-11. Nesse contexto é importante citar também o recente trabalho de Bissonauth et al.<sup>81</sup>, que observaram aumento de LDL-colesterol, apenas em hamsters alimentados com dieta acrescida de 2% do isômero *trans*-10, *cis*-12, em comparação com o *cis*-9, *trans*-11, durante 28 dias, embora os conteúdos de colesterol e triacilglicerol hepáticos tivessem diminuídos.

Sabe-se que o CLA exerce importante papel no metabolismo lipídico, especialmente no que diz respeito aos sistemas celulares de oxidação que, aliás, é o que explica muitas das propriedades fisiológicas desse ácido graxo. Foi o trabalho de Belury et al.<sup>82</sup> um dos primeiros a demonstrar de forma mais clara o papel do CLA no metabolismo lipídico. Ainda era obscuro o entendimento das

rotas metabólicas do CLA no organismo e como este influenciaria o metabolismo dos lipídeos dos vários tecidos, de forma a melhorar o perfil lipídico. Mas, esses autores demonstraram, em camundongos, que o CLA afeta a interconversão metabólica dos ácidos graxos no fígado, resultando na modulação do perfil de ácidos graxos e na produção de eicosanóides araquidônicos nos tecidos extrahepáticos. As evidências, em roedores, de que o CLA apresentava ação hipolipidemiante, por meio da indução da  $\beta$ -oxidação em diversos tecidos, mas especialmente no tecido adiposo, foram surgindo de forma mais constante. Aumento da produção de corpos cetônicos, da razão  $\beta$ -hidroxibutirato/acetoacetato, da atividade de enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, como a acil CoA oxidase e a carnitina-palmitoiltransferase-1, assim como o aumento de glutatona-S-transferase, enzima afetada por proliferador de peroxissoma, contribuíram para a conclusão de que o CLA aumenta a oxidação de ácidos graxos<sup>83,84</sup>. O trabalho de Sergiel et al.<sup>85</sup> foi fundamental para comprovar essa hipótese. Os autores demonstraram, em ratos, por meio da administração dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 de CLA marcados com <sup>14</sup>C, que estes são muito mais utilizados nos sistemas oxidativos celulares que o ácido linoléico (usado como controle). E ainda que o CLA é convertido por dessaturases e elongases a outros ácidos graxos poliinsaturados conjugados, como 18:3, 20:3 e 20:4. Para dar mais subsídios à hipótese acima, recentemente Macarulla et al.<sup>86</sup> e Zabala et al.<sup>87</sup> demonstraram, em hamsters, que o isômero *trans*-10, *cis*-12 de CLA (0,5% a 1% em relação a uma dieta aterogênica durante 6 semanas) aumenta a atividade da carnitina-palmitoiltransferase-1 e acil-CoA oxidase, permitindo a conclusão de que a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos musculares foi induzida pelo CLA, embora os autores tenham observado efeitos tóxicos no fígado desses animais por meio de análise histológica.

A ação do CLA sobre o metabolismo lipídico, caracterizada pela inibição do armazenamento de ácidos graxos, os quais serão oxidados para fornecer energia, associada à inibição

também da entrada de glicose nos adipócitos pode levar à alteração no metabolismo da insulina e causar situações de hiperinsulinemia. A inibição do armazenamento de ácidos graxos e glicose, especialmente pelo isômero *trans*-10, *cis*-12, leva ao acúmulo desses substratos na corrente sanguínea, caracterizando um estado de lipodistrofia (particularmente pelo acúmulo de ácidos graxos não esterificados), que, por sua vez, está relacionado com a resistência à insulina local e geral, propiciando o desenvolvimento de diabetes lipopatrófica. Tal situação já foi observada em camundongos<sup>88,89</sup> e em humanos<sup>8,79,90</sup>. Na verdade, o início das pesquisas da influência do CLA sobre o metabolismo da glicose e da insulina foi caracterizado pela busca da melhora da resistência à insulina, como demonstraram Houseknecht et al.<sup>91</sup> em ratos Zucker suplementadas com 2% de mistura de isômeros de CLA por 2 semanas. Mas, esses resultados não foram consensuais nos estudos subsequentes, que buscaram identificar o efeito do CLA sobre a resistência à insulina. Alguns pesquisadores encontraram resultados positivos, ou seja, a diminuição da tolerância à glicose em ratos da linhagem Zucker<sup>18,19</sup>, outros, na direção oposta, não demonstraram nenhuma influência, como os de Hargrave et al.<sup>22</sup> e Simón et al.<sup>92</sup> com camundongos e hamsters, respectivamente. Os estudos de Choi et al.<sup>17</sup> e Ross et al.<sup>21</sup> deram contribuições importantes para o entendimento desses resultados dúbios. Os autores demonstraram, em ratos Sprague-Dawley e em camundongos *knockout* para Apo E, respectivamente, que o efeito do CLA sobre a resistência à insulina é isômero dependente, sendo o *trans*-10, *cis*-12 CLA responsável pelo aumento da resistência à insulina e o *cis*-9, *trans*-11 CLA responsável pela redução da resistência à insulina.

Os indicadores utilizados nos trabalhos citados acima incluem glicose plasmática, teste de tolerância à glicose, proteínas desacopladoras (UCP) e determinação da atividade de enzimas chave no metabolismo de lipídios e glicose como a fosfoenolpiruvatocarboxilase, a glicose-6-fosfatase, a glucoquinase, a acil-CoA oxidase e o ácido graxo sintase. Dentre os mecanismos que explicam

a melhora da resistência à insulina, particularmente pelo isômero *cis*-9, *trans*, 11, o aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo e no fígado e o aumento do gasto energético estão entre os mais discutidos pelos autores.

Quanto aos mecanismos envolvidos na ação deletéria do CLA sobre a sensibilidade à insulina, estudos com culturas de adipócitos primários indicam que a ativação do fator de transcrição NFκB - o qual regula a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-8 -, explicaria o aumento da sensibilidade à insulina. Essas citocinas pró-inflamatórias seriam as responsáveis pela redução da expressão do transportador de glicose insulino-dependente (GLUT4) e pela inibição da atividade do receptor de insulina, caracterizando o quadro de sensibilidade à insulina<sup>20,21,93</sup>.

Mas o fato é que, em humanos, é quase que unânime entre os pesquisadores o efeito negativo do consumo de CLA sobre o metabolismo de glicose e insulina. Com exceção do trabalho de Belury et al.<sup>94</sup>, que observaram redução da glicose plasmática em indivíduos portadores de diabetes tipo 2, a maioria dos estudos revisados demonstrou aumento de glicose plasmática, tendência para aumento da insulina plasmática e redução da sensibilidade à insulina<sup>8,65,79,90,95</sup>. Apenas os trabalhos recentes de Tricón et al.<sup>80</sup> e de Taylor et al.<sup>96</sup> reúnem dados que os permitem concluir que ambos os isômeros de CLA não apresentaram efeitos adversos sobre as concentrações plasmáticas de glicose e insulina e sobre a sensibilidade à ação da insulina.

Todos os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lipídeos e glicose, discutidos até agora, são responsáveis pelo efeito redutor de gordura corporal, atribuído particularmente ao isômero *trans*-10, *cis*-12 do CLA. A capacidade do CLA de alterar de forma positiva a composição corporal, por meio da redução da massa gorda e do aumento de massa magra, já foi comprovada em muitos modelos experimentais, inclusive em humanos, desde o final da década de 90. O primeiro trabalho a demonstrar tal propriedade do CLA foi o de Park

et al.<sup>4</sup>, que demonstraram, em camundongos suplementados com 0,5% de CLA durante 28 e 32 dias, redução de cerca de 60% da gordura corporal, resultante da redução da deposição de gordura, do aumento da lipólise nos adipócitos e do aumento da oxidação de ácidos graxos, tanto no músculo quanto no tecido adiposo. Pouco tempo depois o mesmo grupo demonstrou que o isômero de CLA responsável pela redução da gordura corporal é o *trans*-10, *cis*-12<sup>97</sup>. Na mesma época Deckere et al.<sup>69</sup> e Ostrowska et al.<sup>98</sup> também demonstraram, em hamsters e porcos, respectivamente, a redução de peso e de gordura corporal após suplementação com CLA. Quanto aos estudos com humanos, Zambell et al.<sup>99</sup> tentaram demonstrar o efeito de redução da gordura corporal em mulheres saudáveis com índice de massa corporal normal, mas, seus resultados não foram significativos, ou seja, o consumo de 3g/dia de CLA durante 64 dias não alterou a composição corporal dos indivíduos. No mesmo ano Blankson et al.<sup>100</sup> e Berven et al.<sup>101</sup> também demonstraram os efeitos do CLA sobre a composição corporal em indivíduos com sobrepeso ou obesidade sendo que, somente no estudo de Blankson et al.<sup>100</sup> houve redução da gordura corporal após 12 semanas de suplementação com quantidades acima de 3,4g de CLA/dia; no entanto, nenhum mecanismo que explicasse o efeito redutor da gordura corporal foi discutido pelos autores.

A partir de então muitos foram os estudos com diversos animais<sup>102-104</sup>, com culturas de adipócito de roedores e humanos<sup>105-109</sup> e com humanos<sup>8,65,74-80,90,95,96,110-116</sup>, que surgiram com o objetivo de avaliar a propriedade de redução da gordura corporal, bem como elucidar os mecanismos de ação pelos quais o CLA desempenha esse papel.

As hipóteses metabólicas para explicar a ação redutora de gordura corporal do CLA são muitas, mas as investigações tiveram seu início baseado no controle pelo CLA da expressão de genes envolvidos na diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros. Em outras

palavras, a inibição da expressão desses genes resultaria na redução da lipogênese. Tal hipótese foi reforçada por Brodie et al.<sup>117</sup>, Choi et al.<sup>118</sup>, Takahashi et al.<sup>104</sup> e Kang et al.<sup>109</sup>, cujos trabalhos com culturas de pré-adipócitos 3T3-L1 e adipócitos humanos demonstram que o CLA inibe a ativação de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes codificantes das proteínas C/EBP $\alpha$ , SCD e GLUT4, todas envolvidas no processo de diferenciação de células adiposas. Na verdade, os estudos apontam que a redução da gordura corporal induzida pelo CLA ocorre não somente pela diminuição do número de adipócitos, mas também, ou até mesmo somente, pela redução do seu tamanho. Considerando que o tamanho da célula adiposa está diretamente relacionado com o conteúdo de triacilgliceróis em seu interior, a redução desse lípide induzida pelo CLA resultaria, conseqüentemente, na diminuição do tamanho da célula<sup>3,102,108</sup>. É importante discutir que o mecanismo de ação responsável pela redução de triacilgliceróis induzida pelo CLA ainda necessita de maiores esclarecimentos. A diminuição, particularmente pelo isômero *trans*-12, *cis*-12 CLA, da síntese de enzimas envolvidas na lipogênese (como a lipase lipoprotéica, acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintase), responsáveis pela clivagem dos ácidos graxos das lipoproteínas circulantes para ressíntese de triacilglicerol (LPL) e pela síntese de novo dos lípidos biológicos (ACC e FAS), tem sido reportada por muitos pesquisadores<sup>88,97</sup>. Por outro lado, como já discutido, o aumento da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos mitocondrial e peroxissomal induzido pelo CLA, também poderia ser responsável pela redução da síntese de triacilgliceróis e, dessa forma, contribuir para a não deposição dos mesmos no adipócito, reduzindo, assim, o seu tamanho<sup>84,119,120</sup>.

O aumento da termogênese induzida pelo CLA tem sido discutido também como responsável pela redução da gordura corporal, já demonstrada em camundongos AKR/J, Std ddY e C57BL/6J e ratos ZDF<sup>88,121-123</sup>. Segundo Tsuboyama-Kasaoka et al.<sup>88</sup> e Ryder et al.<sup>122</sup>, o aumento do gasto energético observado nesses animais é resultante do

aumento da expressão de genes que codificam as proteínas desacopladoras (UCP), especialmente a UCP-2, visto que os autores encontraram aumento dos níveis tanto do mRNA quanto da proteína no tecido adiposo branco, músculo esquelético e fígado dos animais.

A descoberta do gene *ob*, que codifica uma proteína denominada leptina, trouxe contribuições ímpares para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no controle hipotalâmico da ingestão alimentar. A leptina é sintetizada no tecido adiposo e secretada no plasma em proporção direta ao tamanho do adipócito, ou seja, quanto maior é o adipócito maior também é a concentração de leptina plasmática. Nesse sentido, é esperado que o efeito redutor de gordura corporal do CLA tenha relação com os níveis de leptina<sup>124</sup>. De fato, pesquisadores objetivando estudar essa relação demonstram que o consumo de CLA reduz os níveis sanguíneos de leptina em ratos OLETF<sup>119</sup> e ratos Sprague-Dawley<sup>125</sup>. Esses efeitos, contudo, não foram observados por Corino et al.<sup>71</sup> e Medina et al.<sup>126</sup>, cujos trabalhos foram realizados com humanos e coelhos, respectivamente. Mesmo que controversos, os estudos supracitados fornecem subsídios para especular sobre a ação do CLA no controle da sinalização celular e, conseqüentemente, na produção dessa adipocitocina tão importante para o controle da ingestão alimentar.

Este grupo de pesquisa tem demonstrado que ratos Wistar saudáveis, suplementados durante 3 ou 6 semanas com 2% de misturas comerciais de CLA, contendo os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11 em iguais proporções, apresentam redução da gordura corporal total de cerca de 20% em relação ao grupo controle. A concentração sérica de leptina dos ratos suplementados com CLA é menor, quando comparada com o controle e está correlacionada positivamente com a gordura corporal desses animais<sup>127</sup>. Tem-se demonstrado, também, que misturas comerciais de CLA reduzem a atividade da lipase lipoprotéica ligada à heparina em cultura de adipócitos 3T3-L1<sup>128</sup>.

Enquanto estudos com animais e cultura de células adiposas de roedores e humanos reúnem dados comprovando o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA, os ensaios clínicos não são tão promissores assim. Isso porque, na grande maioria deles, os indivíduos não apresentaram redução da gordura corporal. De todos os trabalhos revisados, cuja síntese pode ser observada no Quadro 1, poucos relataram redução significativa da gordura corporal. Todos esses estudos, cujos resultados são positivos, incluíram homens e mulheres com sobrepeso ou obesidade e foram placebo controlados. O CLA administrado constituiu mistura dos dois isômeros predominantes, *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11, em iguais proporções entre eles. As doses diárias e o tempo de suplementação variaram entre 1,8 e 4,2g/dia e 4 semanas e 12 meses, respectivamente. Com exceção do trabalho de Thom et al.<sup>110</sup>, que usaram hidrogel como placebo, os demais estudos tiveram como placebo óleo de oliva. Quanto à amostragem, participaram dos 5 estudos 329 indivíduos, tendo o de Thom et al.<sup>110</sup> a menor amostragem (n=20) e o de Gaullier et al.<sup>115</sup> a maior (n=180). É importante ressaltar que a avaliação da composição corporal dos sujeitos das pesquisas foi feita por diferentes metodologias, as quais incluíram antropometria<sup>79</sup>, radioabsorciometria de feixes duplos (DEXA)<sup>100,115</sup> e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)<sup>110</sup>. Embora os autores não tenham comprovado os mecanismos que explicam o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA, os resultados são discutidos com base naqueles que já foram identificados em animais e em cultura de adipócitos. O aumento da lipólise, a redução da atividade da lipase lipoprotéica e o aumento da atividade da carnitina-palmitoiltransferase-1, levando à redução do acúmulo de ácidos graxos no adipócito e ao aumento da oxidação de ácidos graxos nos tecidos adiposo e muscular, estão entre os mecanismos mais discutidos. Zambell et al.<sup>99</sup> tentaram avaliar a redução da gordura corporal em resposta ao aumento do gasto energético decorrente do consumo de CLA. O mesmo mecanismo foi proposto para explicar a redução da gordura corporal pelo

CLA, mas nenhuma alteração do gasto energético foi observada por esses pesquisadores.

Até o presente momento, observa-se certa dificuldade por parte da comunidade científica em comprovar o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA em humanos, haja vista a grande divergência dos resultados obtidos nos ensaios clínicos. Tais divergências, provavelmente, se devem às diferenças entre os indivíduos incluídos nas pesquisas que, possivelmente, respondem de forma diferente à suplementação com CLA. A população dos estudos é muito heterogênea e inclui indivíduos de ambos os sexos, normais ou não quanto ao seu índice de massa corporal, e saudáveis ou portadores de alterações do metabolismo de lipídeos e/ou de glicose. Além disso, há que considerar também, mesmo em uma população homogênea, a individualidade bioquímica resultante das diferenças genéticas entre os indivíduos. É imprescindível que se chegue a um consenso a respeito da suplementação com CLA objetivando a redução da gordura corporal, visto que essa é a propriedade fisiológica do CLA mais desejada pela população que busca o consumo desse composto como um coadjuvante na melhora na qualidade de vida.

### **CLA e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo**

Pouco tempo depois da descoberta do CLA, Issemann & Green<sup>129</sup> identificaram um membro de uma classe de receptores nucleares pertencentes à superfamília do receptor nuclear dos hormônios esteróide, retinóide e tireóide, todos dependentes de ligantes, denominado receptor ativado por proliferador de peroxissomo - PPAR. Já foram identificadas 3 isoformas desse receptor nuclear, PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\beta$  e PPAR  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$ , as quais são codificadas por genes diferentes e expressas de forma distinta em diversos tecidos, mas todas envolvidas na regulação do metabolismo de lipídeos e glicose, na diferenciação celular, bem como no desenvolvimento do câncer e no controle da resposta inflamatória. Basicamente, os PPARs  $\alpha$  e  $\beta$

**Quadro 1.** Síntese dos ensaios clínicos incluídos nesta revisão que demonstraram algum efeito do ácido linoléico conjugado sobre a composição corporal, o metabolismo de lipídes e glicose e a peroxidação lipídica.

Sujeitos (n) (F/M)	Estado nutricional dos sujeitos segundo IMC	Tipo do suplemento CLA	Suplemento (dose-g/dia)	Tempo de suplementação	Controle	Efeito sobre a gordura corporal	Efeito sobre metabolismo		Efeito sobre a peroxidação lipídica	Referência
							lipídes	glicose		
52 (35/17)	Sobrepeso e obesidade	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12	1,7	12 semanas	Óleo de oliva	Redução	Efeito não significativo	-	-	Blankson et al. <sup>100</sup>
53 (26/27)	Sobrepeso	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12	4,2	12 semanas	Óleo de oliva	-	-	-	Aumento de 8-iso-prostaglandina F <sub>2</sub> α e de 15-ceto-diidro-prostaglandina F <sub>2</sub> α	Basu et al. <sup>11</sup>
53 (27/26)	Sobrepeso	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12	4,2	12 semanas	Óleo de oliva	Redução	Efeito não significativo	Sem efeito	-	Smedman & Vessby <sup>79</sup>
20 (10/10)	Eutrófico	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12	1,8	12 semanas	Hidrogel	Redução	-	-	-	Thom et al. <sup>110</sup>
60 (0/60)	Sobrepeso e obesidade	Mistura com 35,4% de c9, t11 e 35% de t10, c12	3,4	12 semanas	-	Efeito não significativo	Redução de HDL	Efeito não significativo	Aumento de 8-iso-prostaglandina F <sub>2</sub> α	Risérus et al. <sup>65</sup>
60 (0/60)	Sobrepeso e obesidade	Mistura com 2,9% de c9, t11 e 76,5% de t10, c12	3,4	12 semanas	-	Efeito não significativo	Redução de HDL	Aumento da glicemia e redução da sensibilidade à insulina	-	Risérus et al. <sup>90</sup>
25 (0/25)	Obesidade	Mistura com 83% de c9, t11 e 7,3% de t10, c12	3,0	12 semanas	Óleo de oliva	Efeito não significativo	Efeito não significativo	Redução da sensibilidade à insulina	Aumento de 8-iso-prostaglandina F <sub>2</sub> α e de 15-ceto-diidro-prostaglandina F <sub>2</sub> α	Risérus et al. <sup>8</sup>
52 (35/17)	Sobrepeso e obesidade	Mistura com 37% de c9, t11 e 37% de t10, c12	6,0	52 semanas	Óleo rico em ácido oléico	Efeito não significativo	Redução de HDL e aumento de TAG	Sem efeito	-	Whigham et al. <sup>78</sup>
180 (149/31)	Sobrepeso	Mistura com 39% de c9, t11 e 41% de t10, c12 na forma de AGL e mistura com 38% de t10, c12 e 38% de c9, t11 na forma de TAG	3,4	12 meses	Óleo de oliva	Redução quando CLA foi administrado como AGL e efeito não significativo quando administrado como TAG	Aumento de Lpa	Sem efeito	-	Gaullier et al. <sup>77</sup>
60 (0/60)	Sobrepeso e obesidade	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12 e Mistura contendo predominantemente t10, c12	3,5 e 4,0	4 semanas	Óleo de oliva	-	-	-	Aumento de 8-iso-prostaglandina F <sub>2</sub> α e de 15-ceto-diidro-prostaglandina F <sub>2</sub> α	Smedman et al. <sup>9</sup>
134 (110/24)	Sobrepeso	Mistura com 50% de c9, t11 e 50% de t10, c12	3,4	24 meses	Óleo de oliva	Redução	Aumento de Lpa	Sem efeito	-	Gaullier et al. <sup>115</sup>
16 (0/16)	Sobrepeso e obesidade	Manteiga enriquecida com CLA (80% de c9, t11)	2,39	2 períodos consecutivos de 8 semanas	Manteiga com baixo teor de CLA	Efeito não significativo	Pequena redução de CT e aumento da razão cHDL/CT	-	-	Desroches et al. <sup>116</sup>

F: feminino; M: masculino; (-) Sem dados; IMC: índice de massa corporal. CLA: ácido linoléico conjugado.



estão envolvidos no metabolismo de lípidos e glicose e o PPAR  $\gamma$  está envolvido na diferenciação de adipócitos<sup>130</sup>. Em 1992 Gottlicher et al.<sup>131</sup> demonstraram que os ácidos graxos provenientes da dieta também poderiam atuar como ligantes de PPARs e, dessa forma, modular a expressão dos genes que estão sob seu controle transcricional. Enquanto as drogas hipolipemiantes, como os fibratos e as antidiabéticas, como as tiazolidinonas (TZDs), têm afinidade por isômeros específicos, PPAR  $\alpha$  e PPAR  $\gamma$ , respectivamente, os ácidos graxos são conhecidos como ligantes promíscuos por se ligarem em todas as isoformas de PPAR.

A identificação desses receptores nucleares foi determinante para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos do CLA, os quais parecem estar todos relacionados com a ativação ou a inibição, direta ou indiretamente, das diferentes isoformas de PPAR e, conseqüentemente, com a modulação da expressão dos genes controlados pelas mesmas. Os primeiros trabalhos a respeito da ativação de PPAR mediada por CLA foram realizados com o objetivo de buscar os mecanismos moleculares da ação anticancerígena desse composto. Moya-Camarena et al.<sup>132</sup> demonstraram, em células de câncer hepático de ratos, que a redução da proliferação celular poderia ser decorrente da ativação de PPAR $\alpha$ , em especial pelo isômero *cis-9, trans-11*. Os autores encontraram quantidades elevadas de mRNA para as proteínas sob o controle transcricional desse PPAR, como a Acil CoA oxidase, proteína ligadora de ácido graxo e citocromo P450AIVA1. Entretanto, esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que, em ratos Sprague-Dawley, a ativação de PPAR $\alpha$  não aconteceu de forma significativa. Embora houvesse aumento de mRNA para acil CoA oxidase (ACO) e proteína ligadora de ácido graxo (FABP), esse aumento foi muito pequeno (cerca de 10x menor), quando comparado ao modulado pelo Wy-14,643, um potente fibrato agonista de PPAR $\alpha$ <sup>133</sup>. Recentemente, Lampen et al.<sup>134</sup> demonstraram que a inibição da proliferação de células de câncer de cólon (HT-29) poderia

estar relacionada com a inibição de PPAR  $\beta$  pelo isômero *cis-9, trans-11*. No entanto, esses autores demonstraram, por meio de ensaios de transativação utilizando genes reporters, que o *cis-9, trans-11* CLA ativa o PPAR  $\beta$ , ou seja, mesmo que os resultados comprovem que o CLA age sobre o PPAR  $\beta$ , não há conclusões claras que possam explicar a ação anti-proliferativa das células de câncer de cólon. A ativação pelo CLA do PPAR  $\gamma$  também foi reportada como responsável pela inibição da proliferação celular e pela indução de apoptose em glioblastomas<sup>135</sup>.

Os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lípidos e glicose e sobre a composição corporal têm sido explicados pela modulação da expressão gênica exercida por esse ácido graxo conjugado, mediada pela ativação ou inibição de PPARs, em especial o PPAR  $\gamma$ . A ativação de PPAR  $\gamma_2$  pelo CLA, particularmente pelo isômero *trans-10, cis-12*, tem sido demonstrada em cultura de adipócitos 3T3-L1 de roedores, como mecanismo responsável pela redução da composição corporal<sup>118,136</sup>. É importante ressaltar que, segundo Evans et al.<sup>137</sup>, a ativação de PPAR  $\gamma_2$  pelo *trans-10, cis-12* CLA modularia o efeito redutor da gordura corporal em curto prazo (48h), visto que os autores observaram inibição de PPAR  $\gamma_2$  quando o tempo de contato com o CLA aumentou (6 dias). A maioria dos estudos objetivando buscar os alvos moleculares da ação redutora da gordura corporal pelo CLA em adipócitos, reúne dados que permitem concluir que a inibição de PPAR  $\gamma$ , particularmente pelo *trans-10, cis-12* CLA, levaria à redução da gordura corporal pela modulação da expressão gênica no sentido de inibir a diferenciação celular e alterar a atividade de proteínas envolvidas na lipogênese e na lipólise<sup>109,136</sup>. É importante a ressalva de que, nos estudos citados anteriormente, o tempo de exposição dos adipócitos aos isômeros de CLA até os efeitos serem observados foi superior a 5 dias, confirmando que, em longo prazo, segundo Evans et al.<sup>136</sup>, o efeito do *trans-10, cis-12* CLA é de fato inibir PPAR  $\gamma$ . Um dado interessante é o do trabalho de Brown et al.<sup>138</sup>, segundo o qual quando as células foram

expostas ao isômero *cis*-9, *trans*-11, houve aumento de PPAR  $\gamma$  e, conseqüentemente, das proteínas codificadas pelos genes que estão sob seu controle transcricional, promovendo a adipogênese. Tal achado traz contribuições ímpares a respeito da suplementação com misturas de isômeros de CLA. Ao considerar que o isômero *cis*-9, *trans*-11 aumenta PPAR  $\gamma$ , esse pode atuar como antagonista da ação do isômero *trans*-10, *cis*-12. Frente aos diferentes resultados encontrados na literatura, sobre a ativação e/ou inibição dos PPARs pelo CLA, pode-se especular que as ações antagonistas que os dois isômeros predominantes de CLA exercem um sobre o outro, podem explicar os resultados da não redução da gordura corporal.

O aumento de PPAR  $\gamma$  e também do PPAR  $\beta$  induzido pelo CLA, observado em alguns estudos, está relacionado com a ação antiinflamatória, também atribuída a esse composto. Tal ação já foi estudada em animais, como camundongos e porcos, e também em cultura de células da musculatura lisa da artéria coronária humana, para avaliar a regressão de doença inflamatória intestinal e da aterosclerose, respectivamente. Quanto ao efeito antiinflamatório do CLA na doença inflamatória intestinal pode-se dizer que a influência desse composto sobre a atividade dos PPAR  $\gamma$  e PPAR  $\beta$  está relacionada com a repressão da expressão de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e da ativação do NF- $\kappa$ B, e também com a indução de citocinas imunoregulatórias, como o fator de crescimento TGF- $\beta_1$ . A inibição da ativação de NF- $\kappa$ B também foi observada em células da musculatura lisa da artéria coronária de humanos. A associação com a inibição da produção de prostaglandina resultante do metabolismo do ácido araquidônico via cicloxigenases, também observada nessas células, pode explicar o efeito anti-aterogênico do CLA observado *in vivo*<sup>139-141</sup>.

Já é conhecido pela comunidade científica que ácidos graxos poliinsaturados da família omega-3 (PUFA n-3), como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), apresentam atividade imunomodulatória e antiin-

flamatória<sup>142,143</sup>. Entretanto, chama atenção o fato de que a presença desses ácidos graxos pode interferir na ação do CLA sobre o PPAR  $\gamma$ , como foi observado no recente trabalho de Bassaganya-Riera et al.<sup>141</sup>, estudando porcos com doença inflamatória intestinal. Apesar disso, os autores concluíram que o CLA e os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) n-3 agem sinergicamente na regressão da doença, pois os PUFA n-3 ativam PPAR  $\beta$ , o que resultou na aceleração da regeneração colônica e da remissão clínica da doença.

Quando se discute a influência do CLA sobre as distintas isoformas de PPAR é importante entender se efeitos induzidos pelo CLA sobre a expressão dos genes, que estão sob o controle transcricional de qualquer PPAR, são decorrentes do aumento ou da redução da expressão de um determinado PPAR ou da ação agonista ou antagonista que o CLA exerce sobre a atividade de ligação do PPAR ao DNA. De acordo com os resultados dos trabalhos incluídos nesta revisão, pode-se chegar à conclusão de que o CLA modula a expressão gênica, tanto pelo controle da expressão do PPAR<sup>109,118,136,139,141</sup> quanto pela ação sobre a atividade de ligação do PPAR ao DNA<sup>132,135,137,138,140</sup>.

Os trabalhos citados acima reúnem resultados sobre indução e inibição da expressão das isoformas de PPAR, assim como aumento ou redução da atividade de ligação do PPAR ao DNA. Esses resultados explicam os mecanismos moleculares da ação do CLA sobre o metabolismo de lípidos e glicose, a alteração da composição corporal e a regressão de doenças inflamatórias e câncer. Entretanto, o que se observa é que os trabalhos, ora *in vitro* ora *in vivo*, trazem protocolos experimentais diferentes uns dos outros, os quais resultam em respostas diversas, dificultando o entendimento do processo. Nesse contexto, vale comentar o trabalho recente de Benjamin et al.<sup>144</sup>, que avaliaram *ex vivo* a capacidade de ligação do *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 CLA às diferentes isoformas de PPAR e, posteriormente, desenvolveram um sistema para avaliar o potencial de ativação, pelos isômeros de CLA, de genes

controlados por PPAR em roedores e em humanos. Os resultados de Benjamin et al.<sup>145</sup> contribuíram bastante para a compreensão da capacidade que o CLA tem em se ligar aos diferentes tipos de PPAR. Porém, contradizem resultados de muitos estudos *in vivo*, além de trazer novas informações para incrementar o quadro sobre o potencial de ativação, pelo CLA, dos PPARs em humanos. Em primeiro lugar, ficou claro que os dois isômeros de CLA atuam como ligantes desses fatores de transcrição, mas com afinidades diferentes. Segundo os resultados dos autores, o isômero *trans*-10, *cis*-12 tem mais afinidade com o PPAR  $\alpha$ , já o *cis*-9, *trans*-11 se liga mais com o PPAR  $\beta$ . Quanto à capacidade de ligação ao PPAR  $\gamma$ , esta foi igual para os dois isômeros de CLA. Os ensaios de transativação mediado por PPAR nas células de roedores, demonstraram que a afinidade pelas isoformas de PPAR seguiu a seguinte ordem: PPAR  $\alpha$  > PPAR  $\beta$  > PPAR  $\gamma_1$  > PPAR  $\gamma_2$ . Além disso, o isômero *trans*-10, *cis*-12 se ligou a todas as isoformas de PPAR em menor proporção, quando comparado ao isômero *cis*-9, *trans*-11. No que diz respeito aos ensaios de transativação no sistema humano, os resultados foram inesperados até para os próprios autores. Para estudar o potencial de ativação dos isômeros de CLA em humanos, os autores desenvolveram o sistema de ativação completo, ou seja, consideraram a heterodimerização do PPAR com o receptor do ácido retinóico (RXR) e seu respectivo ligante, o ácido retinóico, visto que a heterodimerização é requisito básico para a ligação com o DNA. Surpreendente e diferentemente do esperado, que seria o aumento do potencial de ativação, o que aconteceu foi uma redução desse, particularmente do *cis*-9, *trans*-11 CLA, quando as células foram transfectadas com o elemento responsivo (PPER),  $\beta$ -galactosidase e os receptores PPAR e RXR, em comparação com aquelas que foram transfectadas com o elemento responsivo (PPER),  $\beta$ -galactosidase PPAR sozinho. Aparentemente não há hipóteses para explicar essa redução do potencial de ativação, mas um achado importante foi que a redução da ativação aumentou quando a concentração de ácido retinóico foi maior. Levando em consideração que

homodímeros de RXR, induzidos pelo ácido retinóico, podem ativar genes que estão sob o controle transcricional de PPAR pela ligação com seu respectivo PPRE no DNA, os autores especulam que pode ter havido homodimerização de RXR, em decorrência da presença de grandes concentrações de ácido retinóico e, conseqüentemente, a redução do potencial de ativação do CLA.

A descoberta do PPAR é muito recente e, desde então, sua atividade biológica vem sendo estudada de forma constante e exaustiva. Ainda é preciso, no entanto, aprofundar o conhecimento sobre a atuação desses receptores nucleares como fatores de transcrição. Se a própria descoberta do PPAR é recente e muito ainda é necessário aprender sobre eles, a ativação dos mesmos pelo CLA é ainda mais imatura. Até o momento, as pesquisas acumulam elementos que apontam que o CLA pode modular a expressão gênica via PPAR, desencadeando distintas atividades biológicas que auxiliam o controle de uma série de situações patológicas. Entretanto, ainda há muito o que avançar até estabelecer um consenso sobre essa modulação da expressão gênica induzida pelo CLA nos humanos, o que pode ser um poderoso recurso na prevenção e no controle de muitas doenças metabólicas.

## PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Este trabalho reúne informações científicas que catalogam as propriedades fisiológicas do CLA, as quais servem como subsídios para alegar seu potencial como ingrediente funcional a ser utilizado na prevenção e no controle de inúmeras desordens metabólicas crônicas. Os resultados reportados, em todos os trabalhos aqui discutidos, são decorrentes da administração do CLA na forma de suplementação, já que as concentrações desse composto nas carnes, nos leites e em seus respectivos derivados não são suficientes para que os efeitos fisiológicos sejam atingidos.

Nesse contexto, pergunta-se: um alimento de consumo básico do público alvo enriquecido

com CLA, desde que tenha viabilidade tecnológica para tanto, apresentaria efeitos fisiológicos benéficos similares aos do CLA administrado na forma de suplementos? Essa resposta poderá delinear novas perspectivas para as pesquisas com CLA, ao considerar os efeitos adversos que a suplementação, por ser caracterizada pela utilização de altas doses, pode trazer. Até que ponto a suplementação com CLA pode ser utilizada sem riscos à saúde? Essa é uma pergunta difícil de responder devido à escassez de estudos sobre o consumo de suplemento de CLA durante longos períodos de tempo. A maioria dos estudos apresenta tempos de suplementação relativamente curtos, com média de 4 a 6 semanas, de forma que são raros os estudos com meses de duração. Existem evidências em animais e, mesmo que controversas e um tanto quanto escassas, em humanos de que o CLA promove efeitos benéficos em curto prazo, mas a grande questão é a seguinte: esses efeitos se prolongam por quanto tempo? E os efeitos adversos do consumo de CLA em longo prazo?

Alguns pesquisadores tentaram responder essas perguntas planejando ensaios cujo tempo de suplementação com CLA foram considerados longos. Gaullier et al.<sup>77</sup>, Whigham et al.<sup>78</sup> e Larsen et al.<sup>145</sup> suplementaram indivíduos de ambos os sexos, com sobrepeso e/ou obesidade, com concentrações que variaram entre 3,4g/dia<sup>77,145</sup> e 6g/dia<sup>78</sup> durante 1 ano. De acordo com o protocolo experimental desses estudos, nenhum efeito adverso sobre o metabolismo de lípidos e glicose foi observado nos indivíduos. No entanto, no estudo de Gaullier et al.<sup>77</sup> 68% dos participantes relataram 264 eventos adversos, entre os quais 30 foram considerados pelos pesquisadores relacionados com o CLA. Desconforto, dores abdominais e dispepsia foram o efeitos mais relatados. Whigham et al.<sup>78</sup>, embora não tenham observado nenhum efeito adverso, não recomendam o consumo de suplemento de CLA por mulheres grávidas ou em período de lactação, para evitar alterações quantitativas e qualitativas no leite. Diferentemente de Gaullier et al.<sup>77</sup> e Whigham et al.<sup>78</sup>, Larsen et al.<sup>145</sup> avaliaram também o efeito

da suplementação em longo prazo com CLA na recuperação do peso e da gordura corporal perdidos, e chegaram à conclusão de que o CLA não previne essa recuperação, pois os indivíduos apresentaram recuperação de 4,0kg (Desvio-padrão - DP= 5,6) e 2,1kg (DP=5,0) de peso e gordura corporal, respectivamente, a qual não foi diferente do grupo placebo. Recentemente, Gaullier et al.<sup>115</sup> publicaram os resultados da continuidade de seu trabalho anterior<sup>77</sup>. O estudo mais recente foi conduzido por mais 12 meses (com cerca de 70% dos indivíduos do estudo inicial) completando um período total de 24 meses de suplementação com CLA, caracterizando o período mais longo de suplementação da história das pesquisas com CLA. Os autores, além de concluir que a suplementação com misturas de isômeros de CLA reduziu significativamente a gordura e o peso corporal e que esta redução não teve relação com a dieta ou exercício, também concluem que a suplementação foi segura, visto que as alterações observadas estão dentro do normal.

A despeito do que os autores acima citados demonstraram sobre a segurança do CLA, ainda existem declarações de efeitos adversos com sérias conseqüências, as quais devem ser consideradas. Entende-se que a melhor solução para reduzir a incidência de obesidade e doenças associadas é a prevenção e, neste sentido, o consumo de alimentos enriquecidos com CLA ao longo da vida, com quantidades necessárias para que haja a modulação dos efeitos benéficos e a inexistência dos efeitos adversos, parece ser uma alternativa viável.

Este grupo de pesquisa nos últimos três anos, tem demonstrado que este composto é capaz de reduzir significativamente a gordura corporal, além de promover aumento do conteúdo de minerais em ratos, o que pode indicar aumento da mineralização óssea. A influência do CLA sobre o processo de autoxidação dos lípidos biológicos também tem sido identificada nestas pesquisas. A depender do indicador biológico utilizado para

avaliar este processo, os resultados têm demonstrado que o CLA pode funcionar como um antioxidante e, conseqüentemente, atuar como coadjuvante na prevenção e no controle de inúmeras doenças relacionadas com estresse oxidativo. Por outro lado, sendo o CLA um dieno conjugado, o aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo não está descartado, como observado em alguns indicadores determinados nos experimentos dos autores deste trabalho, que tiveram seus valores aumentados após suplementação com CLA. As perspectivas daqui em diante são de aprofundamento das investigações sobre a ação do CLA em humanos, no sentido de reforçar as pesquisas brasileiras sobre o tema em questão e tornar disponível para a população, com o respaldo da legislação vigente, um produto seguro que possa ser utilizado como coadjuvante na prevenção e no controle da obesidade e de doenças associadas.

Por fim, as mais recentes investigações sobre os mecanismos moleculares de ação do CLA reforçam cada vez mais o conceito da nutrigenômica. A biologia molecular moderna tem contribuído com fortes avanços no que diz respeito à modulação da expressão gênica induzida por compostos presentes na alimentação humana, sejam eles convencionalmente considerados nutrientes ou não. Os resultados têm sido surpreendentes e, ao mesmo tempo, promissores buscando preencher lacunas da medicina e da nutrição clínica.

#### COLABORADORES

L.F. SANTOS-ZAGO, A.P. BOTELHO e A.C. OLIVEIRA participaram da elaboração do projeto de pesquisa, da tabulação e da discussão dos resultados e da elaboração do artigo.

#### REFERÊNCIAS

1. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 1987; 8(12): 1881-7.
2. Wang YM, Jones PJH. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *Int J Obes*. 2004; 28(8):941-55.
3. Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J Nutr*. 2001; 131(6): 1668-74.
4. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*. 1997; 32(8):853-8.
5. Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. *Rev Nutr*. 2005; 18(4):561-5.
6. Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res*. 1990; 50:1097-101.
7. Flintoff-Dye NL, Omaye ST. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutr Res*. 2005; 25(1):1-12.
8. Risérus U, Vessby B, Årnlöv J, Basu S. Effects of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(2):279-83.
9. Smedman A, Vessby B, Basu S. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by  $\alpha$ -tocopherol and cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Sci*. 2004; 106(1):67-73.
10. Pratico D, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12(6):243-7.
11. Basu S, Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett*. 2000; 468(1):33-6.
12. Yamasaki M, Mansho K, Mishima H, Kimura G, Sasaki M, Kasai M, et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(12):6367-71.
13. Cantwell H, Devery R, O'shea M, Stanton C. The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids*. 1999; 34(8):833-9.
14. Van Den Berg JJ, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*. 1995; 30(7):599-605.
15. Choi JS, Song J. Conjugated linoleic acid, obesity, and insulin resistance: waiting for the day of liberation from chronic disease. *Nutrition*. 2005; 21(11-12):1170-2.

16. Brown JM, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid in humans: Regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr.* 2003; 133(10):3041-6.
17. Choi JS, Jung MH, Park HS, Song J. Effect of conjugated linoleic acid isomers on insulin resistance and mRNA levels of genes regulating energy metabolism in high-fat-fed rats. *Nutrition.* 2004; 20(11-12):1008-17.
18. Nagao K, Inoue N, Wang YM, Yanagita T. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310(2): 562-6.
19. Teachey MK, Taylor ZC, Maier T, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Jacob S, et al. Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat. *Metabolism.* 2003; 52(9):1167-74.
20. Chung S, Brown JM, Provo JN, Hopkins R, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte resistance through NF $\kappa$ B-dependent cytokine production. *J Biol Chem.* 2005; 280(46):38445-56.
21. Roos B, Rucklidge G, Reid M, Ross K, Duncan G, Navarro MA, et al. Divergent mechanisms of *cis*9, *trans*11-and *trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. *Faseb J.* 2005; 29(29):1746-8.
22. Hargrave KM, Azain MJ, Kachman SD, Miner JL. Conjugated linoleic acid does not improve insulin tolerance in mice. *Obes Res.* 2003; 11(9):1104-15.
23. Clément L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, et al. Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res.* 2002; 43(9):1400-9.
24. Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA. The role of delta-9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11. *J Nutr Biochem.* 2001; 12(11):622-30.
25. Martin SA, Jenkins TC. Factors affecting conjugated linoleic acid *trans*-C<sub>18:1</sub> fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci.* 2002; 80(12): 3347-52.
26. Alonso L, Cuesta EP, Gilliland SE. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J Dairy Sci.* 2003; 86(6):1941-6.
27. Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$  desaturase. *J Nutr.* 2000; 130(9):2285-91.
28. Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, Cook ME, Sih CJ, Pariza MW. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1486(2-3):285-92.
29. Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res.* 2001; 40(4):283-98.
30. Christie WW. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J Lipid Res.* 1982; 23(7):1072-5.
31. Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal.* 1992; 5:185-97.
32. Ritzenthaler KL, McGuire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, McGuire MA. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J Nutr.* 2001; 131(5):1548-54.
33. Jiang J, Wolk A, Vessby B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70(1):21-7.
34. Fritsche J, Steinhart H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Eur Food Res Technol.* 1998; 206: 77-82.
35. National Academy of Sciences (USA). Dietary reference intakes for energy, carbohydrates, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2002.
36. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: identification and quantification in natural and processed cheeses. *J Agric Food Chem.* 1989; 37:75-81.
37. Ip C, Chin SF, Scimeca JA, Pariza MW. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 1991; 51(22):6118-24.
38. Chujo H, Yamasaki M, Nou S, Koyanagi N, Tachibana H, Yamada K. Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2003; 202(1):81-7.
39. Masso-Welch PA, Zangani D, Ip C, Vaughan MM, Shoemaker SF, McGee SO, et al. Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *J Nutr.* 2004; 134(2):299-307.
40. Tanmahasamut P, Liu J, Hendry LB, Sidell N. Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. *J Nutr.* 2004; 134(3): 674-80.

41. Liu J, Sidell N. Anti-estrogenic effect of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. *Breast Cancer Res Tr*. 2005; 94:161-9.
42. Albright CD, Klem E, Shah AA, Gallagher P. Breast cancer cell-targeted oxidative stress: enhancement of cancer cell uptake of conjugated linoleic acid, activation of p53, and inhibition of proliferation. *Exp Mol Pathol*. 2005; 79(2):118-25.
43. Miglietta A, Bozzo F, Bocca C, Gabriel L, Trombetta A, Belotti S, Canuto RA. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signaling and mitochondrial pathway. *Cancer Lett*. 2006; 234(2): 149-57.
44. Kim JH, Hubbard NE, Ziboh V, Erickson KL. Attenuation of breast tumor cell growth by conjugated linoleic acid via inhibition of 5-lipoxygenase activating protein. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1736(3):244-50.
45. Degner SC, Kemp MK, Bowden GT, Romagnolo DF. Conjugated linoleic acid attenuates cyclooxygenase-2 transcriptional activity via an anti-AP-1 mechanism in MCF-7 breast cancer cells. *J Nutr*. 2006; 136(2):421-7.
46. Liew C, Shut HAJ, Chin SF, Pariza MW, Dashwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis*. 1995; 16: 3037-43.
47. O'Shea M, Stanton C, Devery R. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. *Anticancer Res*. 1999; 19(3A):1953-60.
48. Park HS, Ryu JH, Ha YL, Park Y. Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Brit J Nutr*. 2001; 86:549-55.
49. Park HS, Cho HY, Ha YL, Park JHY. Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem*. 2004; 15(4):229-35.
50. Lim DY, Tyner AL, Park JB, Lee JY, Choi YH, Park JHY. Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21<sup>CIP1/WAF1</sup>. *J Cell Physiol*. 2005; 205(1):107-13.
51. Cho HJ, Kim EJ, Lim SS, Kim MK, Sung MK, Kim JS, et al. *Trans*-10, *cis*-12, not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr*. 2006; 136:893-8.
52. Lee SH, Yamaguchi K, Kim JS, Eling TE, Safe S, Park Y, et al. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. *Carcinogenesis*. 2006; 27(5):972-81.
53. Ip C, Briggs SP, Haeghele AD, Thompson HJ, Storkson J, Scimeca JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*. 1996; 17(5):1045-50.
54. Hubbard NE, Lim D, Erickson KL. Beef Tallow increases the potency of conjugated linoleic acid in the reduction of mouse mammary tumor metastasis. *J Nutr*. 2006; 136(1):88-93.
55. Agatha G, Voigt A, Kauf E, Zintl F. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. *Cancer Lett*. 2004; 209(1):87-103.
56. Ochoa J, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD, Wahle WJ. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. *Carcinogenesis*. 2004; 25(7):1185-91.
57. Lui OA, Mak NK, Leung KN. Conjugated linoleic acid induces monocytic differentiation of murine myeloid leukemia cells. *Int J Oncol*. 2005; 27(6): 1737-43.
58. Song HJ, Sneddon AA, Heys SD, Wahle KWJ. Induction of apoptosis and inhibition of NF- $\kappa$ B activation in human prostate cancer cells by the *cis*-9, *trans*-11 but not the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Prostate*. 2006; 66: 839-46.
59. Kuniyasu HK, Yoshida K, Sasaki T, Sasahira T, Fujii K, Ohmori H. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. *Int J Cancer*. 2006; 118(3):571-6.
60. Yang L, Leung LK, Huang Y, Chen ZY. Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(8):3072-6.
61. Tsuzuki T, Igarashi M, Iwata T, Ymauchi-Sato Y, Yamamoto T, Ogita K, et al. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and  $\alpha$ -tocopherol. *Lipids*. 2004; 39(5):475-80.
62. Miyazawa T, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M. Fatty acids with conjugated unsaturation: relationship between oxidative stability and physiological activities. *Lipid Technol*. 2005; 17:221-5.
63. Santos-Zago LF, Botelho AP, Reis SMPM, Oliveira AC. Isomers characterization and autoxidation stability of two conjugated linoleic acid (CLA) supplements. *Annals of the 4<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress*; 2006 Oct; Madrid, Spain; 2006. Abstract LAMI-001.a

64. Basu S, Risérus U, Turpein A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. *Clin Sci*. 2000; 99(6):511-6.
65. Risérus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Årnlöv J, Vessby B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein. *Circulation*. 2002; 106(15):1925-9a.
66. Arab K, Rossary A, Soulère L, Steghens JP. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Brit J Nutr*. 2006; 96(5):811-9.
67. Santos-Zago LF, Botelho AP, Reis SMPM, Oliveira AC. Consumo de CLA tem correlação negativa com indicadores da oxidação lipídica. Anais do 14º Congresso Latinoamericano de Nutrição; 2006 nov; Florianópolis, Brasil; 2006. Abstract NE 0020.b.
68. Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. 1994; 108(1):19-25.
69. Deckere EAM, Amelvoort JMMV, Mcneill GP, Jones P. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br J Nutr*. 1999; 82(4):309-17.
70. Munday JS, Thompson KG, James KA. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr*. 1999; 81(3):251-5.
71. Corino C, Mourot J, Magni S, Pastorelli G, Rosi F. Influence of dietary linoleic acid in growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J Anim Sci*. 2002; 80(4):102-8.
72. Mitchell PL, Langille MA, Currie DL, McLeod RS. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. *Biochim Biophys*. 2005; 1734(3): 269-76.
73. Valeille K, Ferezou J, Amsler G, Quignard-Boulangé A, Parquet M, Gripois D, et al. A *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289:652-9.
74. Benito P, Nelson GJ, Kelly DS, Bartolini G, Schimidt PC, Simon V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*. 2001; 36(3): 229-36.
75. Mougious V, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, et al. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid in human serum lipids and body fat. *J Nutr Biochem*. 2001; 12(10):585-94.
76. Petridou A, Mougious V, Sagredos A. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum and effect on body fat of women. *Lipids*. 2003; 38(8):805-11.
77. Gaullier JM, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(6):1118-25.
78. Whigham LD, O'Shea M, Mohede ICM, Walaski HP, Atkinson RL. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42(10):1701-9.
79. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolic effects. *Lipids*. 2001; 36(8):773-81.
80. Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russel JJ, Jones EL, et al. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(3):614-20.
81. Bissonauth V, Chouinard Y, Marin J, Leblanc N, Richard D, Jacques H. The effects of t10, c12 CLA isomer compared with c9, t11 CLA isomer on lipid metabolism and body composition in hamsters. *J Nutr Biochem*. 2006; 17(9):597-603.
82. Belury M, Moya-Camarena SY, Liu KL, Vanden Heuvel JP. Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. *J Nutr Biochem*. 1997; 8:579-84.
83. Sakono M, Miyanaga F, Kawahara S, Yamauchi K, Fukuda N, Watanabe K, et al. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids*. 1999; 34(9): 997-1000.
84. Martin JC, Grégoire S, Siess MH, Genty M, Chardigny JM, Berdeaux O, et al. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids*. 2000; 35(1):91-8.
85. Sergiel JP, Chardigny JM, Sébédio JL, Berdeaux O, Juanéda P, Loreau O, et al.  $\beta$ -oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. *Lipids*. 2001; 36(12):1327-9.
86. Macarulla MT, Fernandez-Quintela A, Zabala A, Navarro V, Echevarria E, Churruga I, et al. Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. *Nutrition*. 2005; 21(4):521-19.
87. Zabala A, Fernández-Quintela A, Macarulla T, Simón E, Rodríguez VM, Navarro V, et al. Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters. *Nutrition*. 2006; 22(5):528-33.



88. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim H, Tange T, Okuyama H, et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*. 2000; 49(9):1534-42.
89. Clément L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guermillo M, Krief S, et al. Dietary *trans-10*, *cis-12* conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res*. 2002; 43(9):1400-9.
90. Risérus UM, Arner P, Brismar K, Vessby B. Treatment with dietary *trans10*, *cis12* conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2002; 25(9):1516-21b.
91. Houseknecht KL, Vanden Heuvel JP, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, et al. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244(3):911-7.
92. Simon E, Macarulla MT, Churrua I, Fernandez-Quintela A, Portillo MP. *Trans-10*, *cis-12* conjugated linoleic acid prevents adiposity but not insulin resistance induced by atherogenic diet in hamsters. *J Nutr Biochem*. 2006; 17(2): 126-31.
93. Poirier H, Rouault C, Clément L, Niot I, Monnot MC, Guerre-Millo M, et al. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in thymouse. *Diabetologia*. 2005; 48:1059-65.
94. Belury M, Mahon A, Banni S. The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr*. 2003; 133(1):257-60.
95. Moloney F, Yeow TP, Mullen A, Nolan JJ, Roche HM. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(4):887-95.
96. Taylor JSW, Williams RR, James P, Frenneaux MP. Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. *Arterioscl Throm Vas*. 2006; 26(2): 307-12.
97. Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, Cook ME, Sih CJ, Pariza MW. Evidence that the *trans-10*, *cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*. 1999; 34(3): 235-41.
98. Ostrowska E, Muralitharan M, Cross RF, Bauman DE, Dunshea FR. Dietary conjugated acid increases lean tissue and decreases fat deposition in growing pigs. *J Nutr*. 1999; 129:2037-42.
99. Zambell KL, Keim NL, Van Loan MD, Gale B, Benito P, Kelley DS, et al. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids*. 2000; 35(7):777-82.
100. Blankson H, Stakkestad JÁ, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr*. 2000; 130(12):2943-48.
101. Berven G, Bye A, Hals O, Blankson H, Fagertun H, Thom E, et al. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2000; 102:455-62.
102. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr*. 2000; 130(6):15-48, 54.
103. Poulos SP, Sisk M, Hausman DB, Azain MJ, Hausman GJ. Pre and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2001; 131(10):2722-31.
104. Takahashi Y, Kushiro M, Shinohara K, Ide T. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Phys*. 2002; 133(3):395-404.
105. Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000; 223(1): 8-13.
106. Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids*. 2000; 35(8):899-910.
107. McNeel RL, Mersmann HJ. Conjugated linoleic acid isomers influence porcine adipocyte differentiation in vitro. *Faseb J*. 2001; 15:996.
108. Brown M, Evans M, McIntosh M. Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr Biochem*. 2001; 12(7):381-7.
109. Kang K, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. *Trans-10*, *cis-12* inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Co*. 2003; 303(3): 795-9.
110. Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *Med Res*. 2001; 29(5):392-6.

111. Kreider RB, Ferreira MP, Greenwood M, Wilson M, Almada AL. Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *J Strength Cond Res.* 2002; 16(3):325-34.
112. Noone E, Roche H, Nugent A, Gibney M. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2002; 88(3):243-51.
113. Kamphuis M, Lejeune M, Saris M, Westertep-Plantega W. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subject. *Int J Obes Relat Metabol Disord.* 2003; 25:1516-21.
114. Malpuech-Brugère C, Wilhelmine PHG, Verboeket-van V, Mensink RP, Arnal MA, Morio B, et al. Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. *Obes Res.* 2004; 12(4):591-8.
115. Gaullier JM, Halse J, Høye K, Kristiansen K, Fagertun H, Vik H, et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J Nutr.* 2005; 135(4):778-84.
116. Desroches S, Chouinard PY, Galibois I, Corneau L, Delisle J, Lamarche B, et al. Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(2):309-19.
117. Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in pre-confluent cells. *J Nutr.* 1999; 129(3):602-6.
118. Choi YJ, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. The *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulated stearoyl-CoA desaturase gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutrition.* 2000; 130:1920-4.
119. Rahman SM, Wang YM, Yotsumoto H, Cha JY, Han SY, Inoue S, et al. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and  $\beta$ -oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition.* 2001; 17(5):385-90.
120. Evans ME, Brown JM, McIntosh MK. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 2002; 13(9):508-16.
121. West DB, Delany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J. Effects of conjugated linoleic acid on body composition fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol.* 1998; 275(3PT2):667-72.
122. Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris Y, et al. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes.* 2001; 50:1149-57.
123. Terpstra AHM, Beynen AC, Everts H, Kocsis S, Katan MB, Zock PL. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J Nutr.* 2002; 132(5):940-5.
124. Zhang B, Graziano MP, Doebber TW, Leibowitz MD, White-Carrington S, Szalkowski DM, et al. Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and *db/db* mice. *J Biol Chem.* 1996; 271(16):9455-9.
125. Yamasaki M, Ikeda A, Oji M, Tanaka O, Hirao A, Kasai M, et al. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition.* 2003; 19(1):30-5.
126. Medina EA, Horn WF, Keim NL, Havel PJ, Benito P, Kelly DS, et al. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids.* 2000; 35(7):783-8.
127. Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. Correlação entre a gordura corporal e os teores séricos de leptina de ratos wistar suplementados com ácido linoléico conjugado. Anais do 8º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição; 2005; São Paulo, Brasil; 2005. Abstract PO-16-172.
128. Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. Ácido linoléico conjugado reduz a atividade da lipase lipoprotéica. Anais do 14º Congresso Latinoamericano de Nutrição; 2006 nov; Florianópolis, Brasil; 2006. Abstract NE 0099.
129. Issemann I, Green S. Activation of a member of steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990; 347(6294):645-50.
130. Atarod EB, Kehrer JP. Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines. *Free Radical Bio Med.* 2004; 37:36-47.
131. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acid activate a chimeric of the clofibrate-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *P Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(10):4653-7.

132. Moya-Camarena SY, Vanden Heuvel JP, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR $\alpha$ . *J Lipid Res.* 1999; 40(8): 1426-33.
133. Moya-Camarena S, Vanden Heuvel JP. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1436(3):331-42.
134. Lampen A, Leifheit M, Voss J, Nau H. Molecular and cellular effects of *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1735(1):30-40.
135. Cimini AM, Cristiano L, Colafarina S, Benedetti E, Di Loreto S, Festuccia C, et al. PPAR $\gamma$ -dependent effects of conjugated linoleic acid in the human glioblastoma cell line (ADF). *Int J Cancer.* 2005; 117:923-33.
136. Evans M, Park Y, Pariza M, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 and  $\alpha$ 2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids.* 2001; 36(11):1223-32.
137. Granlund L, Juvet LK, Pedersen JI. *Trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR $\gamma$  modulator. *J Lipid Res.* 2003; 44:1441-52.
138. Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, et al. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid Res.* 2003; 44:1287-1300.
139. Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, et al. Acylation of PPAR  $\gamma$  and  $\delta$  by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2004; 127(3):777-91.
140. Ringseis R, Müller A, Herter C, Gahler S, Steinhart H, Eder K. CLA isomers inhibit TNF $\alpha$ -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR $\gamma$  ligand-like action. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1760:290-300.
141. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R. CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clin Nutr.* 2006; 25(3): 454-65.
142. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids.* 1999; 34(4):317-24.
143. Kew S, Gibbons ES, Thies F, McNeill GP, Quinlan PT, Calder PC. The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. *Br J Nutr.* 2003; 90(6):1071-80.
144. Benjamin S, Hanhoff T, Borchers T, Spener F. An improved molecular test system for the screening of human PPAR transactivation by conjugated linoleic acid isomers and their precursor fatty acids. *Eur J Lipid Sci.* 2005; 107:706-15.
145. Larsen TM, Toubro S, Gudmundsen O, Astrup A. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(3):606.

Recebido em: 11/5/2007

Aprovado em: 15/2/2008