

LILIA ZAGO FERREIRA DOS SANTOS

Mestre em Alimentos e Nutrição

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLÉICO
CONJUGADO: INFLUÊNCIA SOBRE A OXIDAÇÃO
DOS LÍPIDES BIOLÓGICOS E CONTEÚDO DE
LÍPIDES HEPÁTICOS DE RATOS WISTAR
SAUDÁVEIS EM CRESCIMENTO**

Tese apresentada como exigência para obtenção do
Título de Doutor em Alimentos e Nutrição - Área
de Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia
de Alimentos à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador
Professor Doutor Admar Costa de Oliveira

UNICAMP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Santos, Lília Zago Ferreira dos
Sa59s Suplementação com ácido linoléico conjugado: influência sobre a
oxidação dos lípides biológicos e conteúdo de lípidos hepáticos de ratos
Wistar saudáveis em crescimento / Lília Zago Ferreira dos Santos. --
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Admar Costa de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Ácido linoléico conjugado. 2. Lípidos hepáticos. 3.
Autoxidação lipídica. 4. Ratos. I. Oliveira, Admar Costa de. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Conjugated linoleic acid supplementation: influence on biological lipid
oxidation and hepatic lipid content in healthy growing Wistar rats.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Conjugated linoleic-acid, Hepatic lipids, Lipid
autoxidation, Rats

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutor em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Admar Costa de Oliveira

Célio Kenji Miyasaka

Gláucia Maria Pastore

Mário José Abdalla Saad

Semíramis Martins Álvares Domene

Thomas Prates Ong

Data da defesa: 14/11/2007

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka
FEA / UNICAMP

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
FEA / UNICAMP

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad
FCM / UNICAMP

Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene
FACULDADE DE NUTRIÇÃO / PUC-CAMPINAS

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
FCF / USP

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Admar Costa de Oliveira pela orientação e por todo ensinamento e estímulo ao desenvolvimento das minhas habilidades e competências para a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão do auxílio financeiro.

À Pharmanutrients, Gurnee/IL/USA, na pessoa de Susie W. Rockway, pela doação da mistura de CLA One® Free Fatty Acid Oil.

À M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda, na pessoa do Prof. Dr. Olavo Rusig, pela doação da mistura vitamínica utilizada na elaboração das dietas experimentais.

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pelo prestimoso apoio técnico, profissionalismo e incentivo ao Trabalho.

À Sra. Maria Susana Corrêa Alves da Cunha por todo auxílio técnico indispensável durante os ensaios biológicos e pelos prazerosos momentos de descontração, sem os quais seria difícil enfrentar as dificuldades.

À todos os colegas e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição que certamente contribuíram de forma importante para a realização desse Trabalho.

Aos funcionários da Coordenadoria de Pós-graduação, em especial o Sr. Cosme Perota, por toda ajuda e esclarecimentos necessários às questões burocráticas.

Ao Laboratório de Micronutrientes / Pontifícia Universidade Católica de Campinas, nas pessoas da Profa. Dra. Semíramis Martins Álvares Domene e da técnica Marlene Maria Torniziello Braz da Silva pelo prestativo auxílio técnico.

Ao Laboratório de Microscopia de Alimentos / Depan / Fea / Unicamp, nas pessoas da Profa. Dra. Débora de Queiroz Tavares e da técnica Yara Fagnani Honório pela valiosa e dedicada assistência técnica.

Ao Laboratório de Produtos Naturais / IB / Unicamp, na pessoa da Dra. Elisângela Faria pelo eficiente auxílio técnico.

Aos membros da Banca Examinadora pelas sugestões e críticas consideravelmente convenientes para o aprimoramento do Trabalho.

À amiga Adriana Botelho com quem pude desenvolver uma parceria que hoje se caracteriza por uma amizade sincera e intensa, essencial para nossas vidas pessoal e profissional.

Ao Marcelo Ferreira dos Santos por todo respeito, apoio e incentivo à minha carreira; por toda paciência e compreensão nos momentos mais difíceis e, principalmente, por todo amor e felicidade.

À minha irmã Raquel Zago, com quem pude dividir todo e qualquer momento dessa trajetória.

Aos meus pais pela educação, incentivo e empenho à minha formação.

Às amigas Elisa, Giovana, Helena, Mônica e Adriana (mais uma vez...), por todos os bons (e maus...) momentos que compartilhamos pessoal e profissionalmente, por todo incentivo e apoio à minha carreira e, sobretudo, pela sincera e dedicada amizade.

Aos amigos que de uma forma ou de outra estavam sempre presentes e interessados, incentivando o meu crescimento profissional e torcendo pelo meu sucesso.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com sugestões e críticas que certamente foram oportunas na realização desse Trabalho.

“O mestre disse a um dos seus alunos: Yu, queres
saber em que consiste o conhecimento? Consiste em
ter consciência tanto de conhecer uma coisa quanto
de não a conhecer. Este é o conhecimento.”

Confúcio

(551 a.C. - 479 a.C.)

RESUMO

SANTOS-ZAGO, Lilia Ferreira. *Suplementação com ácido linoléico conjugado: influência sobre a oxidação dos lípides biológicos e conteúdo de lípides hepáticos de ratos wistar saudáveis em crescimento.* Campinas, 2007. 137f. Tese (Doutorado)-Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

Ácido linoléico conjugado (CLA) é um conjunto de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico, encontrado no leite, carnes e seus respectivos derivados. Desde a sua identificação como um agente anticarcinogênico, muitos outros efeitos lhe foram atribuídos; dentre eles, o efeito antioxidante, efeito um tanto quanto intrigante ao considerar que o CLA é um dieno conjugado, ou seja, um ácido graxo em sua fase inicial de autooxidação, mas com uma de suas ligas duplas conjugadas na forma *trans*. O objetivo desta Tese foi avaliar o efeito da suplementação com CLA, com e sem a presença de antioxidante, sobre o processo de autooxidação dos lípides biológicos, o conteúdo de lípides totais e a morfologia hepática de ratos Wistar saudáveis em crescimento. Foi realizado um ensaio biológico onde sessenta ratos foram divididos em seis grupos (n=10): grupos C (controle), CE (controle + vitamina E), AE (AdvantEdge® CLA), AEE (AdvantEdge® CLA + Vitamina E), CO (CLA One®) e COE (CLA One® + vitamina E). Os grupos controle C e CE receberam ácido linoléico e os grupos suplementados AE, AEE, CO e COE receberam misturas comerciais de CLA distintas cujo conteúdo médio de CLA era de 76,17 % com proporções semelhantes entre os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11. As condições de suplementação foram padronizadas em ensaio preliminar cujos resultados permitiram concluir que a melhor concentração de CLA a ser administrada, levando em consideração os aspectos operacionais e a resposta biológica, era de 2 % em relação ao consumo de dieta. Sendo assim, os ratos foram suplementados com 2 % de CLA por meio de entubação orogástrica durante 42 dias. Para os animais que receberam vitamina E em associação com o CLA, utilizou-se acetato de α -tocoferol na concentração de 30 mg / dia. Foram determinados índice de peróxido (IP), malondialdeído (MDA), 8-iso-PGF_{2 α} isoprostana e atividade da catalase como indicadores da autooxidação lipídica. O conteúdo total de lípides do fígado foi determinado e a morfologia do órgão foi analisada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados demonstraram que a influência do CLA sobre o processo de oxidação dos lípides biológicos depende do tipo do suplemento e do indicador utilizado e seu respectivo local de determinação (tecido ou fluído corporal). Os valores de MDA sérico (AE: 1,80±0,67 mg MDA / kg; CO: 2,43±0,61 mg MDA / kg) e a atividade sérica da catalase (AE: 4734,23±1078,93 kU / L; CO: 5916,06±2490,71 kU / L) foram significativamente menores ($P \leq 0,05$) em comparação com o controle (MDA: 3,85±0,24 mg MDA / kg; catalase:

10496,52±5121,84 kU / L), já os valores de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana foram maiores ($P \leq 0,05$) para o grupo AE (urina: 95,13±20,26 pg / mL; plasma: 18,86±3,41 pg / mL) em relação ao controle (urina: 69,46±16,65 pg / mL; plasma: 13,84±3,55 pg / mL). Quanto ao IP, este foi maior ($P \leq 0,05$) no grupo CO (84,38±10,97mEq / kg) em comparação com o grupo controle (54,75±9,70 mEq / kg). Em relação à associação do acetato de α -tocoferol à suplementação com CLA, esta influenciou a ação do CLA sobre a oxidação dos lípides biológicos para os indicadores catalase, MDA hepático e 8-iso-PGF_{2α} isoprostana urinária, de forma a diminuí-la. O conteúdo dos lípides hepáticos totais não aumentou nos ratos que receberam CLA (C: 23,93±3,64 %; AE: 21,19±2,05 %; CO: 21,16±0,90 %), embora as imagens obtidas por MET tenham demonstrado que houve aumento dos glóbulos de gordura em número e tamanho, aumento esse que não alterou a morfologia do órgão, visto que tanto o citoplasma quanto as organelas celulares estavam íntegras. Esses achados permitiram concluir que a suplementação com 2 % das misturas comerciais de CLA durante 42 dias influenciou o processo de oxidação dos lípides biológicos, no entanto, não foi possível estabelecer um consenso sobre seu efeito antioxidante/pró-oxidante visto a divergência dos resultados. Quanto às imagens hepáticas obtidas por MET, essas caracterizaram uma informação de natureza qualitativa, mas não menos importante, pois permitiu concluir que esse protocolo de suplementação com CLA não promoveu danos morfológicos ao órgão visto a integridade dos hepatócitos.

Termos de indexação: ácido linoléico conjugado, lípides biológicos, lípides hepáticos, autooxidação lipídica, morfologia hepática, ratos.

ABSTRACT

SANTOS-ZAGO, Lilia Ferreira. *Conjugated Linoleic Acid Supplementation: Influence on Biological Lipid Oxidation and Hepatic Lipid Content in Healthy Growing Wistar Rats*. Campinas, 2007. 137f. Tese (Doutorado)-Curso de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

Conjugated linoleic acid (CLA) is a set of geometrical and positional isomers of the linoleic acid, found in milk, meats and their products. Since its identification as an anticarcinogenic agent, other effects have been attributed to it since, among them an antioxidant action -- a rather intriguing claim in view of the fact that CLA is a conjugated diene, i.e., a fatty acid in an early stage of autoxidation, but with one of its conjugated double bonds in the *trans* form. The objective of this Thesis was to assess the effect of CLA supplementation, both in the presence and in the absence of an antioxidant, on: (a) the process of biological lipid autoxidation, (b) the total lipid content, and (c) the hepatic morphology of healthy growing Wistar rats. A biological assay on sixty rats divided into six groups (n=10) was realized: C (control), CE (control + vitamin E), AE (AdvantEdge® CLA), AEE (AdvantEdge® CLA + Vitamin E), CO (CLA One®), and COE (CLA One® + vitamin E). Control groups C and CE received linoleic acid, and supplemented groups AE, AEE, CO and COE received commercial CLA mixtures with a mean CLA content 76.17% and similar proportions of trans-10, cis-12 and cis-9, trans-11 isomers. A preliminary assay was conducted in order to standardize supplementation conditions; its results indicated that the best CLA concentration for administration, taking into account operational aspects and biological response, was 2% of diet intake. Rats were supplemented with that concentration of CLA by orogastric intubation for 42 days. For animals receiving vitamin E in combination with CLA, alpha-tocopherol acetate in the concentration of 30 mg/day was used. Peroxide index (IP), malondialdehyde (MDA), 8-iso-PGF2 alpha isoprostane, and catalase activity were determined as lipid autoxidation indicators. Total liver lipid content was determined, and organ morphology was examined by transmission electronic microscopy (TEM). Results demonstrated that the influence of CLA on the process of biological lipid oxidation depends on supplement type, on the chosen indicator, and on whether it is determined in a tissue or in a body fluid. Serum values of MDA (AE: 1.80±0.67 mg MDA / kg; CO: 2.43±0.61 mg MDA / kg) and catalase serum activity (AE: 4734.23±107893 kU / L; CO: 5916.06±2490.71 kU / L) were significantly lower ($P \leq 0,05$) than in the controls (MDA: 3.85±0.24 mg MDA / kg; catalase: 10496.52±5121.84 kU / L), whereas 8-iso-PGF2 alpha isoprostane were higher ($P \leq 0,05$) for AE (urina: 95.13±20.26 pg / mL; plasma: 18.86±3.41 pg / mL) than in the controls (urina: 69.46±16.65 pg / mL; plasma: 13.84±3.55 pg / mL). IP values were higher ($P \leq 0,05$) for CO (84,38±1097mEq /

kg) than in the control (54.75 ± 9.70 mEq / kg). Regarding the combination of alpha-tocopherol acetate and CLA supplementation, the presence of this antioxidant influenced the action of CLA on biological lipid oxidation as indicated by catalase, hepatic MDA and urinary 8-iso-PGF2 alpha isoprostane. Total hepatic lipid content did not increase in rats receiving CLA (C: 23.93 ± 3.64 %; AE: 21.19 ± 2.05 %; CO: 21.16 ± 0.90 %), although TEM images showed an increase in size and amount of fat globules; this, however, did not change organ morphology, as indicated by the fact that cell cytoplasm and organelles were undamaged. These findings allowed to conclude that supplementation with 2% of commercial CLA mixtures for 42 days influenced the process of biological lipid oxidation. However, no conclusion could be reached as to its anti-oxidant or pro-oxidant effect, because of inconsistencies in the results. Hepatic TEM images, even being a qualitative information, were nevertheless important, as they allowed to conclude that this CLA supplementation protocol did not cause any morphological damage to the organ, as indicated by the integrity of hepatocytes.

Indexing terms: conjugated linoleic acid, biological lipids, hepatic lipids, lipid autoxidation, hepatic morphology, rats.

LISTA DE FIGURAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1.	Estrutura dos isômeros <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 CLA (a), <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA (b) <i>Página</i>	
	e ácido linoléico (c) (PARIZA; PARK; COOK,	
	2001).....	6
Figura 2.	Esquema metabólico proposto para biossíntese de <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2.	
	Adaptado de Chouirnad, Bauman e Baumgard	
	(1999).....	8

LISTA DE FIGURAS ARTIGO I

Figura 1.	Body weight (g) and food consumption (g/rat/period) in control and experimental groups (n=10).....	<i>Página</i> 68
------------------	--	---------------------

LISTA DE FIGURAS ARTIGO II

Figure 1.	Body weight (g) and food consumption (g/rat/period) in control and experimental groups (n=10). Upper figure represent mean weight values (g); lower figure represent mean food consumption (g) in a period of two days. C: control group; AE: group supplemented with AdvantEdge® CLA; CO: group supplemented with One® CLA; * statistical difference between group AE and group C and CO according to Tukey test ($P \leq 0.05$).....	<i>Página</i> 97
Figure 2.	Correlation between CLA intake and liver weight. Although a linear positive correlation has been observed it was small and not significant ($P > 0.05$).....	98
Figure 3.	Hepatic Transmission Electron Microscopy (TEM) images of rats that received supplementation with linoleic acid (a), AdvantEdge® CLA (b) and CLA One® (c). Mi (mitochondria); Rer (rough endoplasmic reticulum); Gl (lipid globule).....	103

LISTA DE FIGURAS ARTIGO III

Figura 1.	Curva da produção de Peróxidos (IP) e Malondialdeído (Valor TBA) das misturas comerciais de CLA (One e EAS) e do ácido linoléico entre os tempos inicial (T_0) e final (T_{90}) da entubação orogástrica.....	<i>Página</i> 122
Figura 2.	Correlação entre o consumo das misturas comerciais de CLA pelos ratos e a concentração sérica de malondialdeído (MDA) e atividade sérica da catalase.....	124
Figura 3.	Correlação entre o consumo das misturas comerciais de CLA pelos ratos e a concentração de seus lípides totais hepáticos.....	126
Figura 4.	Imagens hepáticas obtidas por microscopia ótica de animal que recebeu suplementação com ácido linoléico (C) e com as misturas comerciais de CLA AdvantEdge® CLA (AE) e CLA One® (CO). Gl. Glóbulo de gordura.....	127

LISTA DE FIGURAS APÊNDICES

Figura 1.	Peso corporal e consumo de dieta dos ratos do grupo controle e	<i>Página</i>
	experimentais (n=10) no ensaio biológico	
	preliminar.....	141

LISTA DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1.	Valores médios de CLA e porcentagem do isômero <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 em alguns	<i>Página</i>
	alimentos.....	10

LISTA DE TABELAS ARTIGO I

Table 1.	Fatty acid composition of linoleic acid and commercial conjugated linoleic acid mixtures.....	<i>Página</i> 64
Table 2.	Table 2. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of feed consumption, weight gain and feed efficiency of experimental and control groups over the six week intervention period.....	69
Table 3.	Table 3. Mean values $\pm$ standard deviation of the hepatic peroxide index (n=8), serum (n=6) and hepatic (n=8) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), plasma and urine 8-iso-PGF ₂ α isoprostane (n=6) and serum catalase activity (n=6) in control and experimental groups.....	73

LISTA DE TABELAS ARTIGO II

	<i>Página</i>
Table 1. Isomers composition of conjugated linoleic acid mixtures (g/100g of fatty acids).....	91
Table 2. Composition of experimental diet [16].....	92
Table 3. Steps in the process of infiltration and inclusion of samples in propylene oxide and resin.....	95
Table 4. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of feed consumption, initial and final body weight and feed efficiency of experimental and control groups over the six week intervention period.....	97
Table 5. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of total liver lipid content, liver weight and liver weight:body weight rate of control and experimental groups.....	99

LISTA DE TABELAS APÊNDICES

Tabela 1.	Composição centesimal (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) das dietas experimentais do ensaio biológico preliminar.....	<i>Página</i> 142
Tabela 2.	Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.....	144
Tabela 3.	Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n=5) do conteúdo de lipídios totais do fígado dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.....	144
Tabela 4.	Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n=5) de índice de peróxido (IP) hepático e de malondialdeído séricos e hepáticos dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.....	145
Tabela 5	Composição centesimal (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) das dietas experimentais do ensaio biológico definitivo.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	=	Acetil CoA carboxilase
ACO	=	Acil CoA oxidase
ATF-3	=	Activating transcription factor – 3 / fator de transcrição de ativação – 3
BHT	=	Butylated hydroxytoluene / butil-hidroxi-tolueno
C/EBP α	=	Enhancer binding protein
CAT	=	Catalase
CLA	=	Conjugated linoleic acid / ácido linoléico conjugado
DHA	=	Ácido docosaheptaenóico
DNA	=	Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribinucleico
EPA	=	Ácido eicosapentaenóico
FABP	=	Fatty acid binding protein / proteína ligadora de ácido graxo
FAZ	=	Fatty acid sintase / ácido graxo sintase
GLUT4	=	Transportador de glucose dependente de insulina
GPx	=	Glutathione peroxidase
HDL	=	High density lipoprotein / lipoproteína de alta densidade
IL	=	Interleucine / interleucina
IQ	=	2-amino 3-metilimidazol 4,5- <i>f</i> -quinolína
LDL	=	Low density lipoprotein / lipoproteína de baixa densidade
Lpa	=	Lipoproteína Lpa
LPL	=	Lípase lipoprotéica
mRNA	=	Messenger Ribonucleic Acid / ácido ribonucleico mensageiro
NAG-1	=	Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene / Gene anti-inflamatório não esteróide ativado por droga
PCNA	=	Proliferating cell nuclear antigen / antígeno nuclear de proliferação celular
PLPC	=	1-palmitoil-2-linoleoil fosfatidilcolina
PPAR	=	Peroxisome proliferators activated receptors / receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
PPER	=	Peroxisome proliferator element responsive / elemento responsivo ao PPAR
PUFA	=	Polyunsaturated fatty acid / ácido graxo poliinsaturado
RXR	=	Retinoid x receptor / receptor do ácido retinóico
SCD	=	Stearoil – CoA desaturase / estearoil – CoA dessaturase
SOD	=	Superóxido dismutase

TBARS	=	Thiobarbituric acid reactive substances / substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	=	Tumor necrose factor / fator de necrose tumoral
TZD	=	Thiazolidinedione
UCP	=	Uncoupling proteins / proteínas desacopladoras
VLDL	=	Very low density lipoprotein / lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.	REFERÊNCIAS.....	38
	ARTIGO I.....	60
	ARTIGO II.....	88
	ARTIGO III.....	112
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	135
5.	APÊNDICES.....	138
6.	ANEXOS.....	147

ÍNDICE GERAL

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1	Origem e Consumo de CLA.....	6
2.2	Propriedades Anticarcinogênicas do CLA.....	10
2.3	CLA e Estresse Oxidativo.....	16
2.4	CLA, Metabolismo de Glicose e Lipídios e Composição Corporal.....	22
2.5	CLA e Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo.....	30
2.6	Considerações finais.....	37
3.	REFERÊNCIAS.....	38
	ARTIGO I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats.....	60
	Abstract.....	60
	Introduction.....	61
	Materials and methods.....	63
	Results.....	69
	Discussion.....	74
	Conclusions.....	81
	References.....	82
	ARTIGO II: Conjugated Linoleic Acid, Lipid Accumulation and Hepatic Morphology Alteration in Healthy Wistar Rats.....	88
	Abstract.....	88
	Introduction.....	89

	Materials and methods.....	90
	Results and Discussion.....	96
	Conclusions.....	106
	References.....	106
	ARTIGO III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar....	112
	Resumo.....	113
	Abstract.....	114
	Introdução.....	115
	Material e Métodos.....	116
	Resultados e Discussão.....	120
	Conclusão.....	128
	Referências.....	130
4.	CONCLUSÃO GERAL.....	135
5.	APÊNDICES.....	138
	APÊNDICE A - Propósito, desenho experimental e resultados referentes ao ensaio biológico preliminar.....	139
	APÊNDICE B - Dados adicionais referentes ao ensaio biológico definitivo...	146
6.	ANEXOS.....	147
	ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	148
	ANEXO B – Separata e Protocolos de submissão dos Artigos Originais.....	150

1. INTRODUÇÃO GERAL

Durante muito tempo os lípides provenientes da dieta foram considerados, fundamentalmente, importantes fonte de energia para os organismos animais, até que Burr; Burr (1929), baseados nos trabalhos de Osborne; Mendel (1920/1921), pioneiramente comprovaram a necessidade da presença de lípidos na dieta para prevenir e reverter alterações de pele, déficit de crescimento e comprometimento do metabolismo de ratos; os autores mencionam pela primeira vez o termo essencialidade dos lípidos dietéticos cujo conceito está atualmente relacionado com a incapacidade bioquímica dos mamíferos em sintetizar os ácidos graxos linoléico (C18:2 n-6) e linolênico (C18:3 n-3) dos quais derivam-se os demais ácidos graxos poliinsaturados.

Os efeitos metabólicos dos ácidos graxos poliinsaturados nos organismos animais estão relacionados com a isomeria e a posição de suas duplas ligações; os ácidos graxos poliinsaturados com duplas ligações do tipo *cis* e separadas por um carbono metilênico são os responsáveis por garantir a fluidez adequada das membranas celulares e pela produção de substâncias de importância fisiológica. A maior parte dos ácidos graxos insaturados presente nos alimentos possui duplas ligações na configuração *cis*, de forma que os isômeros *trans* são praticamente inexistentes. No entanto, a dieta fornece ácidos graxos *trans* por meio de alimentos que foram submetidos a processamento tecnológico, como o processo de hidrogenação, em que esses isômeros são formados. Os efeitos adversos do consumo dos ácidos graxos *trans*, particularmente aqueles relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tem sido alvo de estudo nas últimas décadas. Por outro lado, com relação aos ácidos graxos *trans*, deve-se levar em consideração os possíveis efeitos fisiológicos benéficos dos mesmos, os quais estão relacionados com a

prevenção e controle da obesidade e distúrbios metabólicos como dislipidemias e diabetes.

Alguns alimentos possuem pequenas quantidades de um grupo de ácidos graxos *trans* denominado ácido linoléico conjugado (CLA), os quais constituem isômeros do ácido linoléico (C18:2 n-6) quanto à geometria e a posição das duplas ligações. Apenas os animais poligástricos são capazes de sintetizar o CLA, portanto, leite e carne e seus respectivos derivados são as principais fontes desse conjunto de ácidos graxos na dieta (CORL et al., 2001). A identificação do CLA data do final da década de 80 e a partir de então as pesquisas vem acontecendo de forma constante no sentido de compreender cada vez mais as propriedades fisiológicas desse composto (HÁ; GRIMM; PARIZA, 1987). Ainda que existam cerca de cinquenta e seis isômeros de CLA, apenas dois deles possuem atividades biológicas identificadas pela comunidade científica, o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12 (YURAWECZ et al., 1999).

Embora o primeiro efeito fisiológico do CLA identificado tenha sido o efeito anticarcinogênico (HÁ; GRIMM; PARIZA, 1987), atualmente a grande busca por CLA pela população é explicada pela necessidade e desejo de perder peso e reduzir a gordura corporal, visto que esse é um efeito atribuído ao CLA claramente comprovado em roedores (BOTELHO et al., 2005, TAKAHASHI et al., 2002; POULOS et al., 2001; AZAIN et al., 2000; DECKERE et al., 1999; PARK et al., 1999; PARK et al., 1997) e ainda um tanto quanto controverso em humanos (TAYLOR et al., 2006; NOONE et al., 2002; BENITO et al., 2001). Além dos efeitos supracitados, atribui-se também ao CLA uma série de outros efeitos benéficos, dentre eles, a redução de lípides sanguíneos como colesterol total e triacilglicerol, a melhora da resistência à insulina, o aumento da mineralização óssea e a prevenção e melhora do estresse oxidativo (CHOI et al., 2004; NAGAO et al., 2003; TEACHEY et al., 2003; HÁ; GRIMM; PARIZA, 1987). Com base nas pesquisas acima citadas com animais experimentais como roedores, pode-se dizer que os efeitos

anticarcinogênicos e de redução da gordura corporal, não deixam muitas lacunas a serem preenchidas quanto aos aspectos de identificação das mesmas. Já com relação aos outros efeitos, especialmente ao efeito antioxidante do CLA, não há como chegar a um consenso, visto que as informações disponíveis são bastante controversas.

Ao mesmo tempo em que o CLA é amplamente estudado quanto as suas propriedades benéficas à saúde, nos últimos anos, foram muitos os estudos objetivando investigar seus efeitos adversos, os quais podem ser resultantes da própria natureza e estrutura do composto ou das respostas metabólicas dos seus próprios efeitos benéficos. Alguns efeitos adversos do consumo de CLA são identificados em diversos modelos experimentais, sendo os mais estudados, o desenvolvimento de resistência à insulina, o acúmulo de lípidos no fígado e a indução da oxidação dos lípidos biológicos (CHUNG et al., 2005; FLINTOFF-DYE; OMAE, 2005; HARGRAVE et al., 2003; YAMASAKI et al., 2000; VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995). Esse último, foco de estudo desta Tese, é teoricamente um tanto indutivo ao considerar a natureza química do CLA caracterizada por duplas ligações conjugadas, ou seja, fase inicial de sua autooxidação, que a partir de então se propagaria. No entanto, o CLA parece ser estável, talvez pela própria presença de duplas ligações do tipo *trans* que são mais resistentes à oxidação. Embora trabalhos demonstrando a ação antioxidante do CLA ainda sejam publicados (ARAB et al., 2006; KIM et al., 2005), aqueles que demonstram efeito pró-oxidante são em número maior (FLINTOFF-DYE; OMAE, 2005; RISÉRUS et al., 2004; RISÉRUS et al., 2002; YAMASAKI et al., 2000; BASU et al., 2000; VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995).

Quanto aos mecanismos de ação que explicam os efeitos do CLA sejam eles benéficos ou adversos esses são muitos, além de serem complexos. As mais recentes pesquisas demonstram que a ação do CLA sobre uma classe de receptores nucleares recém

identificadas, que atuam como fatores de transcrição pode ser a explicação para os efeitos fisiológicos desse composto (BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2006; RINGSEIS et al., 2006; LAMPEN; LEIFHEIT; NAU, 2005; KANG et al., 2003). Esse cenário atual reforça a influência dos componentes dietéticos na modulação da expressão gênica, tema que vem sendo foco central de pesquisas dentro da Ciência da Nutrição. Nesse contexto se encontra o CLA como importante coadjuvante na prevenção e controle da obesidade e doenças associadas. O grande problema é que a quantidade de CLA nos alimentos fonte é pequena e insuficiente para que os efeitos benéficos sejam alcançados; em todos os trabalhos de investigação das propriedades fisiológicas desse composto a administração foi feita sob a forma de suplemento, em concentrações relativamente altas, o que pode justificar a observação dos efeitos adversos. As perspectivas devem direcionar-se para a busca de uma forma de administração de CLA que promova os efeitos benéficos que lhes são atribuídos e que seja segura no sentido de não ocasionar efeitos deletérios.

Levando em consideração os aspectos referentes à possibilidade de efeitos adversos do consumo de CLA, particularmente o aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo, o objetivo da presente Tese foi avaliar a influência da suplementação com duas misturas comerciais de CLA, com e sem proteção antioxidante, sobre o processo de autooxidação dos lípides biológicos e sobre o conteúdo de lípides hepáticos totais de ratos Wistar saudáveis em crescimento.

A Tese foi desenvolvida sob a forma de Artigo Científico conforme Norma da Comissão de Pós-Graduação/FEA/UNICAMP para Teses em formato alternativo (ATO INTERNO CPG/FEA No. 004/2003). Serão apresentados três Artigos Originais intitulados *“Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats”*, *“Conjugated Linoleic Acid, Lipid Accumulation and Hepatic Morphology Alteration in Healthy Wistar Rats”* e

“Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar” os quais foram submetidos aos Periódicos *Lipids* (aceito para publicação em 29 de maio de 2007; publicado no volume 42, número 9, setembro 2007), *Nutrition* (em revisão sob Protocolo: NUT-D-07-00153R1) e *Revista de Nutrição* (em revisão sob Protocolo 1384), respectivamente. Os Artigos Originais são precedidos de Resumo e Introdução Geral, Revisão Bibliográfica sobre o tema em questão e seguidos de Conclusão Geral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e Consumo de CLA

O CLA corresponde a uma mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas (HA; GRIMM; PARIZA, 1987) (Figura 1). Este composto é encontrado em pequenas quantidades em uma grande variedade de alimentos e estima-se a existência de 56 possíveis isômeros (YURAWEZ *et al.*, 1999).

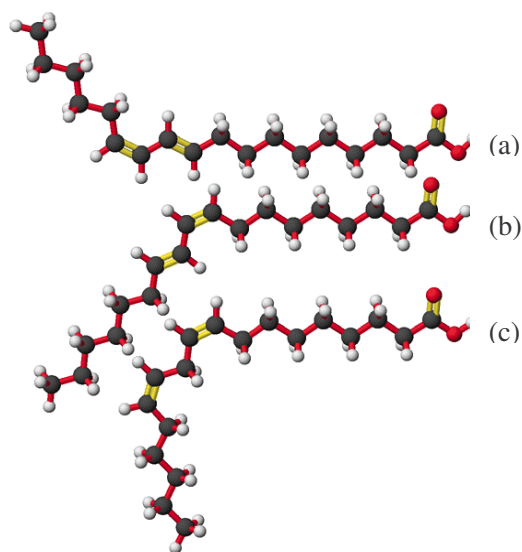


Figura 1. Estrutura dos isômeros *trans*-10 *cis*-12 CLA (a), *cis*-9 *trans*-11 CLA (b) e ácido linoléico (c) (PARIZA; PARK; COOK, 2001).

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) (CORL *et al.*, 2001). 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 (MARTIN; JENKINS, 2002), porém várias outras espécies possuem lipases capazes de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos e, portanto produzir CLA. Entre elas estão a *Lactobacillus casei* e a *Lactobacillus acidophilus* (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003). A isomerização inicial é catalisada pela Δ^{12} cis, Δ^{11} trans-isomerase que com maior frequência é proveniente da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrosolvens* originando o cis-9, trans-11, que após a saturação da dupla ligação cis-9 pela ação de uma redutase, forma o ácido vaccênico (C18:1 trans-11) (MARTIN; JENKINS, 2002). Normalmente a biohidrogenação acontece de forma completa, porém alguns produtos intermediários como o cis-9, trans-11 C18:2, podem atravessar o rúmen, passarem pela corrente sanguínea, serem absorvidos pela glândula mamária e incorporados na 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 e, conseqüentemente o pH, que para favorecer a produção de CLA, deve ser superior a 6,0 (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; MARTIN; JENKINS, 2002). Na Figura 2 está ilustrado um esquema proposto para a biossíntese de CLA em ruminantes. Com relação à síntese nos tecidos dos ruminantes, esta tem início quando o ácido graxo trans-11 C18:1 sofre dessaturação pela enzima Δ^9 dessaturase presente na glândula mamária e no tecido adiposo (GRIINARI *et al.*, 2000).

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 (VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995).

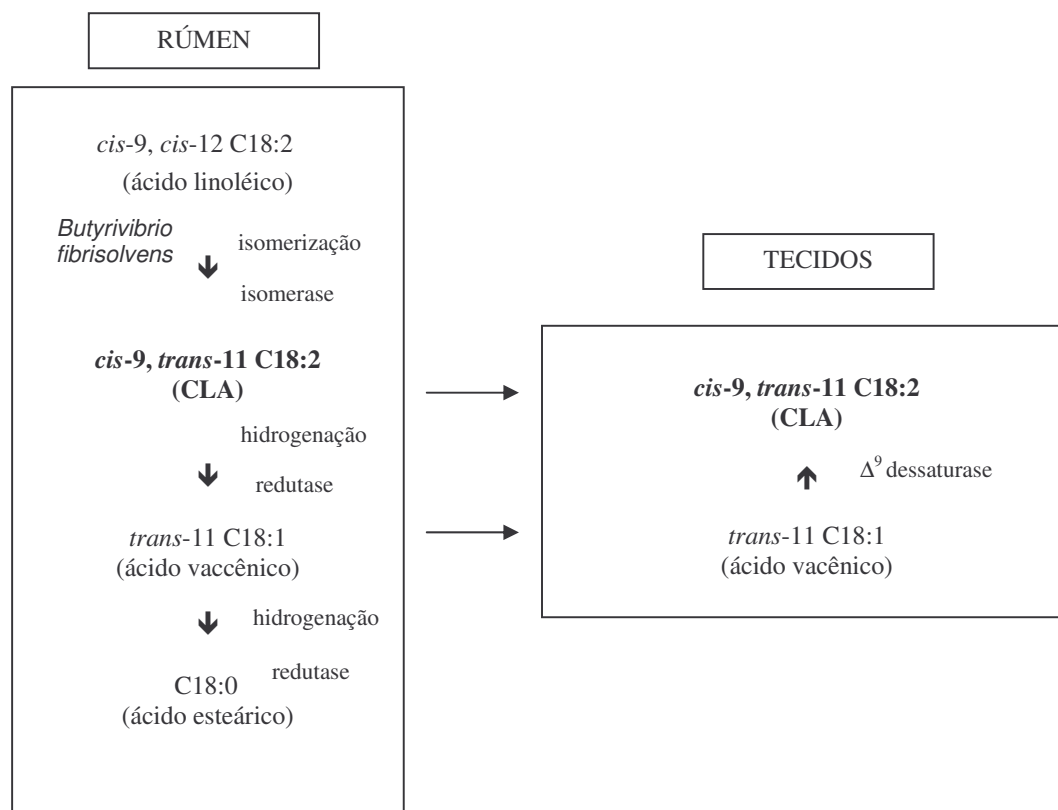


Figura 2. Esquema metabólico proposto para biossíntese de *cis-9, trans-11 C18:2* em ruminantes. Adaptado de Chourirnad, Bauman e Baumgard (1999).

O CLA também pode ser sintetizado quimicamente a partir do ácido linoléico, originando produtos com diferentes composições dos seus isômeros. Este processo pode variar em decorrência da fonte de ácido linoléico utilizada, assim como das condições de isomerização (PARK *et al.*, 2000).

Pelo fato do CLA ser originado por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais e também via Δ^9 dessaturase na glândula mamária e no tecido adiposo, os alimentos derivados de ruminantes, particularmente os produtos lácteos, são as maiores fontes de CLA (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003). Dentre os isômeros de CLA, o *cis-9, trans-11* ocorre em maiores concentrações nos

alimentos. Isto pode ser explicado pelo fato de que nos ruminantes, as dessaturações ocorrem até o carbono 9, não podendo ocorrer além deste, devido à ausência das dessaturases Δ^{12} e Δ^{15} , presente somente nos vegetais. Isto se torna ainda mais importante, ao lembrarmos que a síntese endógena, dependente da ação da Δ^9 dessaturase, é a principal via de formação do CLA (PARIZA; PARK; COOK, 2001). 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 (CHRISTIE, 1982). 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 carne bovina é cerca de 5 e 4 mg / g de gordura, respectivamente, sendo o isômero *cis*-9, *trans*-11 o responsável por mais de 80 % desse conteúdo, como pode ser observado na Tabela 1 (CHIN *et al.*, 1992).

Quanto ao consumo de CLA pela população, este é um tanto quanto difícil de se estimar, mas algumas pesquisas têm sido realizadas com esse intuito (RITZENTHALER *et al.*, 2001; JIANG; WOLK; VESSBY, 1999; FRITSCHKE; STEINHART, 1998). No estudo realizado por Ritzenthaler *et al.* (2001) 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 151 mg/dia e, do isômero *cis*-9, *trans*-11 foi de 193 e 140 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente. Fritsche; Steinhart (1998), na Alemanha, utilizando-se de uma pesquisa de consumo nacional estimaram um consumo de 430 e 350 mg de *cis*-9, *trans*-11/dia para homens e mulheres, respectivamente. Em pesquisa realizada com idosos suecos Jiang; Wolk; Vessby, (1999) encontraram consumo de CLA de 160 mg/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 295 mg/dia para homens e mulheres, respectivamente (NATIONAL ACADEMY..., 2002).

Tabela 1. Valores médios de CLA e porcentagem do isômero *cis*-9, *trans*-11 em alguns alimentos.

Alimento	Total de CLA (mg/g de gordura)	Isômero <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (%)
Leite	5,5	92
Manteiga	4,7	88
Iogurte	4,8	84
Queijo mussarela	4,9	95
Queijo cottage	4,5	83
Carne bovina	4,3	85
Carne ovina	5,6	92
Carne suína	0,6	82
Carne de frango	0,9	84
Carne de peixe	0,3	nd
Óleo de girassol	0,4	38

nd: não detectado

Fonte: CHIN *et al* (1992).

2.2 Propriedades anticarcinogênicas do CLA

A mais antiga das propriedades fisiológicas atribuídas ao CLA é a que está relacionada com a proteção contra a carcinogênese. Na verdade, foram 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; Grimm; Pariza (1987; 1989) isolaram substâncias anticarcinogênicas de extrato de carnes grelhadas, as quais foram identificadas como CLA. A partir de então surgiram muitos 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; Storkson; Pariza (1990) 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, que inibiria a formação de radical hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio tendo ferro como doador de elétron (reação de Fenton) e, conseqüentemente os danos causados pelos radicais hidroxilas nas membranas celulares, os quais estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de muitos processos patológicos, inclusive os processos 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, concentrações ótimas e tempo de exposição para que o efeito benéfico fosse atingido. Em 1991, Ip *et al.* 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, efeito este atribuído ao isômero *cis*-9, *trans*-11 e, dose dependente. A princípio, a propriedade antioxidante do CLA é que seria a responsável pela ação anticarcinogênica, no entanto, 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 CLA 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 (MASSO-WELCH *et al.*, 2004; CHUJO *et al.*, 2003).

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.* (2004) 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) (LIU; SIDELL, 2005).

Os estudos da biologia molecular contribuíram bastante para a identificação de inúmeros mecanismos que explicam as propriedades anticarcinogências dos isômeros de CLA. São muitos os mecanismos já identificados, mecanismos estes 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_L) e pró-apoptótica (caspases iniciadoras e executoras, p53 e Bak) (MIGLIETTA *et al.*, 2006; ALBRIGHT *et al.*, 2005).

Levando em consideração a importância de produtos da oxidação dos lípides 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-hidroxeicosatetraenóico, provavelmente por competição com o ácido araquidônico e inibição da proteína ativadora de 5-lipoxigenase (KIM *et al.*, 2005) além de reduzir a transcrição de ciclooxigenase-2 (DEGNER *et al.*, 2006).

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, pele, intestino delgado e cólon em várias espécies (LIEW *et al.* 1995). Devido ao fato de que tanto IQ quanto CLA estão presentes nas carnes grelhadas, o câncer de cólon também é grande alvo de pesquisas no que diz respeito aos efeitos anticarcinogênicos do CLA. Em 1995, Liew *et al.* 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 muitos foram os estudos objetivando avaliar a relação entre consumo de CLA e regressão de câncer de cólon.

Considerando a influência da peroxidação lipídica sobre câncer, associada ao possível efeito antioxidante do CLA, O'Shea; Stanton; Devery (1999) estudaram a relação entre enzimas antioxidantes e supressão do crescimento de células de câncer de cólon que foram expostas ao CLA. Segundo os resultados dos autores, a exposição das células ao

CLA durante 12 dias aumentou a peroxidação lipídica, e não protegeu as células dos efeitos tóxicos dos produtos resultantes.

Ressalta-se a discrepância dos achados no que diz respeito ao efeito anticarcinogênico do CLA, explicado pela propriedade antioxidante do mesmo. 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 (2005). O trabalho de O'Shea; Stanton; Devery (1999) 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.*, estudando câncer de colon 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 (PARK *et al.*, 2004). Lim *et al.*, em 2005, complementam os achados supracitados, demonstrando que a administração de concentrações fisiológicas de CLA interrompeu o crescimento das células de câncer de cólon, visto que houve um aumento significativo de células na fase G1 do ciclo celular. Este aumento foi acompanhado da indução de p21, proteína que regula negativamente promotores de crescimento celular como antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e as 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 (IP *et al.*, 1991; HA; STORKSON; PARIZA, 1990). Todos 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.* 2006, 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 proteínas regulatórias do mesmo. Os autores demonstraram que apenas o isômero *trans*-10, *cis*-12 teve efeito inibitório sobre o crescimento celular, e que este efeito é decorrente da indução de p21. Corroborando com esses resultados, Lee *et al.*, (2006) também comprovaram que o isômero *trans*-10, *cis*-12 reprime a proliferação celular no câncer colorectal devido a ativação do fator de transcrição 3 (ATF-3), e aumento da expressão do gene pró-apoptótico NAG-1. Ao considerar todo 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 e, não estão relacionados com propriedades antioxidantes do mesmo e sim, com a indução de proteínas apoptóticas, bem como a inibição de promotores do crescimento celular.

Os alimentos que possuem as 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. Objetivando investigar a influência da quantidade e composição dos lípides dietéticos sobre o efeito protetor do CLA contra tumor mamário induzido por dimetilbenzo-antraceno, Ip *et al.* (1996) suplementaram ratos fêmeos

com misturas de óleos vegetais, em diferentes concentrações que variaram de 10 a 20 %, acrescida ou não de 1 % de CLA. Segundo os autores, a ação anticarcinogênica do CLA é independente tanto da quantidade quanto da qualidade dos lípides dietéticos. Mas, não foi a esta conclusão que Hubbard; Lim; Erickson (2006) 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 a medida que aumenta o consumo 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 grande 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 (KUNIYASU *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2006; LUI; MAK; LEUNG, 2005; AGATHA *et al.*, 2004; OCHOA *et al.*, 2004).

2.3 CLA e estresse oxidativo

O efeito do CLA sobre o processo de autoxidação lipídica tem sido bastante estudado nos últimos anos com resultados 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, no entanto, ao levar em consideração o fato de que a conjugação das duplas ligações é um dos primeiros passos da autoxidação 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 da 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 β -hidroxiacroleína a partir da reação dos radicais hidroxila e peroxila de CLA com o oxigênio. Esta estrutura aldeídica seria responsável pela ação antioxidante do CLA por meio da formação de quelato com ferro, inibindo assim as reações de Fenton e, conseqüentemente o início da cadeia de reações da autoxidação lipídica. É importante ressaltar que a preocupação com a relação entre concentração de CLA e seu respectivo efeito antioxidante já existia e foi relatada pelos pesquisadores que propuseram o mecanismo de ação antioxidante, ao alertar que o CLA não apresentava efeito antioxidante em altas concentrações (HA; STORKSON; PARIZA, 1990). Um dos primeiros estudos de avaliação das propriedades antioxidantes do CLA foi o de Ip *et al.* (1991) que suplementaram ratos fêmeos 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 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 somente na glândula mamária.

A estabilidade à oxidação do CLA *in vitro* é alvo de pesquisas, as quais resultam em conclusões divergentes. Mas, é comum a todos esses estudos o fato de que o CLA é mais estável que outros ácidos graxos polinsaturados 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 (MIYAZAWA *et al.*, 2005; TSUZUKI *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2000). 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, no entanto, não é comum a presença desse tipo de informação na maioria dos trabalhos. Outro aspecto fundamental para avaliar a propriedade antioxidante do CLA é a concentração do mesmo. Neste sentido, pode ser citado o trabalho recentemente realizado por Flintoff-Dye; Omaye (2005), que avaliaram 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 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, age inicialmente como pró-oxidante (em concentrações baixas), depois como antioxidante (em concentrações intermediárias) e posteriormente pró-oxidante (em concentrações elevadas), mas 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 que pudesse explicar a ação antioxidante do CLA, ação esta que *in vitro* é mais potente que a do α -tocoferol e similar a do butil hidroxi tolueno (BHT) (HA; STORKSON; PARIZA, 1990), o ato de consumir um ácido graxo em seu estágio inicial de autooxidação, como um agente antioxidante, intrigava a comunidade científica e, de fato não demorou muito para aparecerem os estudos de reinvestigação das propriedades antioxidantes do CLA. Ainda na década de 90, muitos grupos de pesquisadores apontavam indícios de efeito pró-oxidante do CLA, 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-dihidroPGF₂ e 8-iso-PGF_{2 α} isoprostana, respectivamente, e da avaliação da atividade biológica dos sistemas enzimáticos de proteção a oxidação, assim como, de reparo aos danos causados por tal processo como, a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD) (YAMASAKI et al., 2000; CANTWELL et al., 1999; VAN DEN BERG; COOK; TRIBBLE, 1995).

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; Cook; Tribble (1995) foi marcante neste sentido, já que 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. Estes 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 a influência do CLA sobre o sistema enzimático de proteção a oxidação (superóxido dismutase, catalase e glutathione 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 com um agente pró-oxidante. Na tentativa de fundamentar tais resultados os autores chegam a discutir que a resistência dos hepatócitos a ação do CLA poderia ser resultante do amplo estado antioxidante destas células (CANTWELL et al., 1999). A partir de então torna-se cada vez mais difícil o entendimento da influência do CLA sobre a oxidação dos lípides biológicos frente aos resultados contraditórios encontrados pelos diversos grupos de pesquisa da área.

A partir do ano 2000 o número de estudos que afirmam categoricamente 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 um consenso sobre a ação antioxidante ou pró-oxidante do CLA. Já no início dessa década, Yamasaki *et al.* (2000) em estudo realizado com ratos Sprague-Dawley suplementados com 1 % e 2 % de CLA em relação à dieta, 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 oxidativo mais sensíveis, como os eicosanóides da série F, passaram a ser utilizados nos estudos.

A utilização desses indicadores para avaliar o possível efeito pró-oxidante do CLA foi marcante, embora com humanos. Os estudos de Smedmam; Vessby; Basu (2004), Risérus *et al.* (2004), Risérus *et al.* (2002), Basu *et al.* (2000) e Basu; Smedman; Vessby (2000) encontraram altas concentrações de eicosanóides resultantes da oxidação lipídica pelas via enzimática (15-ceto-dihidroPGF₂·) e não enzimática (8-iso-PGF_{2α} isoprostana), considerados atualmente como os indicadores mais sensíveis para este fim, tanto no soro quanto na urina dos sujeitos, cuja conclusão foi unânime a respeito da indução do estresse oxidativo por ambos isômeros de CLA, *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12.

Para intrigar mais ainda a comunidade científica, trabalhos comprovando a atividade antioxidante do CLA ainda são publicados. Recentemente Kim *et al.* (2005) demonstraram que a suplementação com 1,5 % de mistura de CLA em relação à dieta em ratos Sprague-Dawley reduz significativamente a concentração hepática de TBARS e, também a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase, permitindo a concluir que o CLA é um antioxidante. Outro recente achado de extrema importância nesse contexto é o de Arab *et al.* (2006), 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 glutathione sem nenhuma alteração no balanço oxidativo celular. Ao considerar que o aumento, no sangue ou no tecido, de indicadores de oxidação lipídica leva a conclusão de que o sistema biológico em questão estaria sob estresse oxidativo, o fato de que o CLA induz a síntese de glutathione sem levar a oxidação lipídica é, além de incomum, fundamental para a elucidação da influência do CLA sobre o processo de oxidação dos lípidos biológicos.

Há que se 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 câncer (ALBRIGHT *et al.*, 2005; O'SHEA; STANTON; DEVERY, 1999). Ao mesmo tempo, é importante lembrar que os efeitos benéficos do CLA, como o aumento da oxidação dos ácidos graxos, acabam por levar ao aparecimento de efeitos deletérios. Um desses efeitos é o estresse oxidativo, particularmente em situações em que o organismo está deficiente de agentes que o protege contra a oxidação, levando dessa forma ao desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, de forma a favorecer os oxidantes, caracterizando dessa forma o estresse oxidativo.

2.4 CLA, Metabolismo de Glicose e Lipídios e Composição Corporal

Muitos estudos, os quais serão discutidos adiante, têm demonstrado em animais e humanos que o CLA influencia o metabolismo energético promovendo alterações significativas no metabolismo dos lípidos e 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, redução da aterosclerose, melhora da resistência à insulina e redução da gordura corporal, por mecanismos distintos e de forma diferente em animais e 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. Neste 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 (LDL). Lee; Kritchevsky; Pariza (1994) demonstraram que a administração de 0,5 g 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.* (1999), utilizando hamster como modelo experimental, apresentaram resultados que ao mesmo tempo complementam e contradizem os anteriores, visto que os autores encontraram redução não somente de LDL-colesterol, mas também de HDL-colesterol, além de um aumento de 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.* (1999) não observaram redução de aterosclerose em camundongos.

Aparentemente, o motivo pelos quais os resultados são diferentes é desconhecido, no entanto, é importante ressaltar que os modelos experimentais utilizados nos trabalhos supracitados certamente responderiam de maneira distinta ao CLA visto que eles apresentam diferentes graus de sensibilidade à modificações no perfil lipídico da dieta, de forma 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 lípides sanguíneos e na redução da aterosclerose é caracterizado por muitos estudos com resultados positivos em coelhos (CORINO *et al.*, 2002) e alguns em hamsters (MITCHELL *et al.* 2005; VALEILLE *et al.*, 2005). Em humanos os resultados são também contraditórios, visto que a maioria dos estudos não demonstra alteração do perfil lipídico (PETRIDOU; MOUGIOUS; SAGREDOS, 2003; BENITO *et al.*, 2001; MOUGIOUS *et al.*, 2001) e, quando isto acontece, essas alterações não são benéficas como, por exemplo, aumento na concentração de Lpa (GAULLIER *et al.*, 2004), redução de HDL colesterol (principalmente pelo isômero *trans*-10, *cis*-12) e aumento de triacilglicerol (WHIGHAM *et*

al., 2004; RISÉRUS *et al.*, 2002a;) além de aumento de LDL colesterol (SMEDMAN; VESSBY, 2001).

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.* (1997) 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 nos organismo e como este influenciaria o metabolismo dos lípides 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 produção de eicosanóides araquidônicos nos tecidos extrahepáticos. As evidências, em roedores, de que o CLA apresentava ação hipolipidemiante, por meio da indução da β -oxidação em diversos tecidos, mas especialmente no tecido adiposo, foram surgindo de forma mais constante. Aumento da produção de corpos cetônicos, da razão β -hidroxibutirato/acetoacetato, da atividade de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos como a acil CoA oxidase e carnitinapalmitoiltransferase-1, assim como o aumento de glutathione-S-transferase, enzima afetada por proliferador de peroxissoma contribuíram para a conclusão de que o CLA aumenta oxidação de ácidos graxos (MARTIN *et al.*, 2000; SAKONO *et al.*, 1999).

O trabalho de Sergiel *et al.* (2001) 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 ^{14}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 a hipótese acima, recentemente

Macarulla *et al.* (2005) e Zabala *et al.* (2006) 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 β -oxidação dos ácidos graxos musculares foi induzida pelo CLA, embora os autores tenham observado efeitos tóxicos no fígado destes 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 assim o desenvolvimento de diabetes lipoatrófica. Tal situação já foi observada em camundongos (CLÉMENT *et al.*, 2002; TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000) e humanos (RISÉRUS *et al.*, 2004; RISÉRUS *et al.*, 2002b; RISÉRUS *et al.*, 2001; SMEDMAN; VESSBY, 2001).

Na verdade o início das pesquisas da influência do CLA sobre o metabolismo da glicose e insulina foi caracterizado pela busca da melhora da resistência à insulina como demonstraram Houseknecht *et al.* (1998) em ratos Zucker suplementados com 2 % de mistura de isômeros de CLA em relação à dieta por 2 semanas. Mas, esses resultados não foram consensos nos estudos subsequentes objetivando identificar o efeito do CLA sobre a resistência à insulina, embora alguns pesquisadores tenham encontrado resultados positivos, ou seja, a diminuição da tolerância à glicose em ratos da linhagem Zucker

(NAGAO *et al.*, 2003; TEACHEY *et al.*, 2003) ou então resultados que demonstraram nenhuma influência, como os de Hargrave *et al.* (2003) e Simón *et al.* (2006) com camundongos e hamsters, respectivamente. Os estudos de Choi *et al.* (2004) e Ross *et al.* (2005) deram contribuições importantes para o entendimento desses resultados dúbios. Os autores demonstraram em ratos Sprague-Dawley e 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 com o objetivo de avaliar a influência do CLA sobre o metabolismo da glicose e insulina 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, glicose-6-fosfatase, glucoquinase, acil-CoA oxidase e 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 fígado, 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 de GLUT4 e inibição da atividade do receptor de insulina aumentando caracterizando o quadro de sensibilidade à insulina (CHUNG *et al.*, 2005; DE ROSS *et al.*, 2005; POIRIER *et al.*, 2005).

Todos os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lipídios e glicose, discutidos até agora, são responsáveis pela redução da gordura corporal atribuída 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 aumento de massa magra já foi comprovada em muitos modelos experimentais desde o final da década de 90. O primeiro trabalho a demonstrar tal propriedade do CLA foi o de Park *et al.* (1997), que demonstraram em camundongos suplementados com 0,5 % de CLA durante 28 e 32 dias redução de cerca de 60 % da gordura corporal, resultantes da redução da deposição de gordura, aumento da lipólise nos adipócitos e 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 (PARK *et al.*, 1999). Na mesma época Deckere *et al.* (1999) e Ostrowska *et al.* (1999) também demonstraram em hamsters e porcos, respectivamente, a redução de peso e gordura corporal após suplementação com CLA. A partir de então muitos foram os estudos com diversos animais (TAKAHASHI *et al.*, 2002; POULOS *et al.*, 2001; AZAIN *et al.*, 2000) e culturas de adipócito (KANG *et al.*, 2003; MCNELL; MERSMANN, 2001; BROWN; EVANS; MCINTOSH, 2001; PARIZA; PARK; COOK, 2000; EVANS *et al.*, 2000) 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 que estivessem envolvidos na diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros, ou seja, a inibição da expressão desses genes resultaria na redução da lipogênese. Tal hipótese foi reforçada por Brodie *et al.* (1999), Choi *et al.* (2000), Takahashi *et al.* (2002) e Kang *et al.* (2003), 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 α , 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 deste lípide induzida pelo CLA resultaria consequentemente, na diminuição do tamanho da célula (SISK *et al.*, 2001; BROWN; EVANS; MCINTOSH, 2001; AZAIN *et al.*, 2000). 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, as quais são responsáveis pela clivagem dos ácidos graxos das lipoproteínas circulantes para ressíntese de triacilglicerol (LPL) e pela síntese *de novo* dos lípides biológicos (ACC e FAZ) tem sido reportada (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 1999). Por outro lado, como já discutido anteriormente, o aumento da β -oxidação de ácidos graxos mitocondrial e peroxissomal induzida 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 (EVANS; BROWN; MCINTOSH, 2002; MARTIN *et al.*, 2000; RAHMAN *et al.*, 2001).

O aumento da termogênese induzida pelo CLA tem sido discutida também como responsável pela redução da gordura corporal, o qual já foi demonstrado em camundongos AKR/J, Std ddY e C57BL/6J e ratos ZDF (TERPSTRA *et al.*, 2002; RYDER *et al.*, 2001;

TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; WEST *et al.*, 1998). Segundo Tsuboyama-Kasaoka *et al.* (2000) e Ryder *et al.* (2001) 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 (ZHANG *et al.*, 1994). 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. Neste sentido, é esperado que o efeito redutor de gordura corporal do CLA tenha relação com os níveis de leptina. De fato, pesquisadores objetivando estudar essa relação demonstram que o consumo de CLA reduz os níveis sanguíneos de leptina em ratos OLETF (RAHMAN *et al.*, 2001) e ratos Sprague-Dawley (YAMASAKI *et al.*, 2003). No entanto, esses efeitos não foram observados por Medina *et al.* (2000) e Corino *et al.* (2002) cujos trabalhos foram realizados com humanos e coelhos, respectivamente. Mesmo que controversos, os estudos supracitados fornecem subsídios para especular a ação do CLA no controle da sinalização celular e, conseqüentemente na produção dessa adipocitocina tão importante para o controle da ingestão alimentar.

Enquanto muitos estudos com animais e cultura de células adiposas de roedores e humanos reúnem muitos dados comprovando o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA, os estudos clínicos não são tão promissores assim, visto que é difícil estabelecer um consenso frente aos resultados divergentes. Tais divergências provavelmente existem devido às diferenças entre os indivíduos incluídos nas pesquisas que certamente 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 lipídios e/ou glicose (WHIGHAM *et al.*, 2004; GAULLIER *et al.*, 2004; THOM *et al.*, 2001; SMEDMAN; VESSBY, 2001; BLANKSON *et al.*, 2000). Embora os autores não tenham comprovado por meio de seus experimentos os mecanismos que expliquem o efeito redutor da gordura corporal exercido pelo CLA, os mesmos discutem os resultados com base naqueles que já foram identificados em animais e cultura de adipócitos. O aumento da lipólise, a redução da atividade da lipase lipoprotéica e o aumento da atividade da carnitina palmitoiltransferase-1 levando a redução do acúmulo de ácidos graxos no adipócito e ao aumento da oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo e muscular estão entre os mecanismos mais discutidos.

2.5 CLA e Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo

Pouco tempo depois da descoberta do CLA, Issemann; Green (1990) identificaram um membro de uma classe de receptores nucleares pertencentes à superfamília do receptor nuclear dos hormônios esteróide, retinóide e tireóide, todos dependente de ligantes, denominado receptor ativado por proliferador de peroxissomo – PPAR. Já foram identificadas 3 isoformas desse receptor nuclear, PPAR α , PPAR β e PPAR γ_1 e γ_2 , as quais são codificadas por genes diferentes e expressas de forma distinta em diversos tecidos, mas todas envolvidas na regulação do metabolismo de lípidos e glicose, diferenciação celular, bem como no desenvolvimento do câncer e controle da resposta inflamatória. Basicamente, os PPARs α e β estão envolvidos no metabolismo de lípidos e glicose, e o PPAR γ está

envolvido na diferenciação de adipócitos (ATAROD; KEHRER, 2004). Em 1992 Gottlicher *et al.* 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 antidiabetogênicas como as TZDs tem afinidade por isômeros específicos, PPAR α e PPAR γ , respectivamente, os ácidos graxos são conhecidos como ligantes promíscuos uma vez que eles se ligam 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 inibição direta ou indireta 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.* (1999) demonstraram em células de câncer hepático de ratos que a redução da proliferação celular poderia ser decorrente da ativação de PPAR α , em especial pelo isômero *cis*-9, *trans*-11, visto que os autores encontraram quantidades elevadas de mRNA para as proteínas que estão 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 α 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 α (MOYA-CAMARENA; HEUVEL; BELURY, 1999).

Mais recentemente, Lampen; Leifheit; Nau (2005) demonstraram que a inibição da proliferação de células de câncer de cólon (HT-29) poderia estar relacionada com a inibição de PPAR β 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 β , ou seja, mesmo que os resultados comprovem que o CLA age sobre o PPAR β , não há conclusões claras que possam explicar a ação anti-proliferativa das células de câncer de cólon. A ativação pelo CLA do PPAR γ também foi reportada como responsável pela inibição da proliferação celular e indução de apoptose em glioblastomas (CIMINI *et al.*, 2005).

Os efeitos do CLA sobre o metabolismo de lípides e glicose e sobre a composição corporal tem sido muito explicados pela modulação da expressão gênica exercida por esse ácido graxo conjugado mediada pela ativação ou inibição de PPARs, em especial o PPAR γ . A ativação de PPAR γ_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 (CHOI *et al.*, 2000; EVANS *et al.*, 2001). É importante ressaltar que segundo Evans *et al.* (2001), a ativação de PPAR γ_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 γ_2 quando o tempo de contato com o CLA aumentou (6 dias). Na verdade, 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 γ , particularmente pelo *trans*-10, *cis*-12 CLA, levaria a redução da gordura corporal por meio da modulação da expressão gênica no

sentido de inibir a diferenciação celular e alterar a atividade de proteínas envolvidas na lipogênese e lipólise (KANG *et al.*, 2003; GRANLUND *et al.*, 2003).

Ressalta-se 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.* (2001), o efeito do trans-10, cis-12 CLA é de fato inibir PPAR γ . Um dado interessante é o do trabalho de Brown *et al.* (2003) que quando as células foram expostas ao isômero *cis*-9, *trans*-11, houve aumento de PPAR γ 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 γ , 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 dos dois isômeros predominantes de CLA, que um exerce sobre o outro, podem explicar os resultados cuja redução da gordura corporal não foi observada.

O aumento de PPAR γ e também do PPAR β induzido pelo CLA, observado em alguns estudos, está relacionado com a ação anti-inflamatória também atribuída a esse composto, ação esta já estudada em animais como camundongos e porcos e também em cultura de células da musculatura lisa da artéria coronária humana objetivando avaliar a regressão de doença inflamatória intestinal e aterosclerose, respectivamente. Quanto ao efeito anti-inflamatório do CLA na doença inflamatória intestinal, pode-se dizer que a influência desse composto sobre a atividade dos PPAR γ e PPAR β está relacionada com a repressão da expressão de fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da ativação do NF- κ B e também com a indução de citocinas imunoregulatórias como o fator de crescimento TGF-

β_1 . A inibição da ativação de NF- κ B também foi observada em células da musculatura lisa da artéria coronária de humanos cuja associação com a inibição da produção de prostaglandina resultantes do metabolismo do ácido araquidônico via cicloxigenases, também observada nessas células, pode explicar o efeito anti-aterogênico do CLA observado *in vivo* (RINGSEIS *et al.*, 2006; BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2006; BASSAGANYA-RIERA *et al.*, 2004).

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 anti-inflamatória (KEW *et al.*, 2003; KELLEY *et al.*, 1999), no entanto, é importante chamar atenção para o fato de que a presença desses ácidos graxos pode interferir a ação do CLA sobre o PPAR γ , como foi observado no recente trabalho de Bassaganya-Riera; Hontecillas (2006) estudando porcos com doença inflamatória intestinal. Apesar disso, os autores acabaram por concluir que o CLA e PUFA n-3 agem sinergicamente na regressão da doença visto que os PUFA n-3 ativam PPAR β 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 redução da expressão de um determinado PPAR ou pela 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 a conclusão de que o CLA modula a expressão gênica tanto pelo controle da expressão do PPAR (BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2006; BASSAGANYA-RIERA *et al.*, 2004; WARREN *et al.*, 2003;

KANG *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2000) quanto pela ação sobre a atividade de ligação do PPAR ao DNA (RINGSEIS *et al.*, 2006; CIMINI *et al.*, 2005; LAMPEN; LEIFHEIT; NAU, 2005; GRANLUND *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2003; BELURY *et al.*, 2002; MOYA-CAMARENA *et al.*, 1999; MOYA-CAMARENA; HEUVEL; BELURY, 1999).

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, resultados esses que explicam os mecanismos moleculares da ação do CLA sobre o metabolismo de lípidos e glicose, alteração da composição corporal e 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, tornando o complicado entendimento do processo. Nesse contexto, vale comentar o trabalho recente de Benjamin *et al.* (2005) 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 humanos.

Os resultados de Benjamin *et al.* (2005) contribuíram bastante para a compreensão da capacidade que o CLA tem em se ligar aos diferentes tipos de PPAR, no entanto, 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 α , já o *cis*-9, *trans*-11 se liga mais com o PPAR β . Quanto a capacidade de ligação ao PPAR γ , 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 α > PPAR β > PPAR γ_1 > PPAR γ_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), β -galactosidase e os receptores PPAR e RXR em comparação com aquelas que foram transfectadas com o elemento responsivo (PPER), β -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, no entanto, ainda é preciso conhecer muito

mais 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 que se estudar no sentido de estabelecer um consenso sobre essa modulação da expressão gênica induzida pelo CLA nos humanos, visto que isso pode ser um poderoso recurso na prevenção e controle de muitas doenças metabólicas.

2.6 Considerações finais

Essa Revisão Bibliográfica foi realizada para fundamentar a hipótese desta Tese e 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 controle de inúmeras desordens metabólicas crônicas. Vale ressaltar que os resultados reportados em todos os trabalhos aqui discutidos são decorrentes da administração do CLA na forma de suplementação, visto que a concentração desse composto nas carnes, leites e seus respectivos derivados não são suficientes para que os efeitos fisiológicos sejam observados.

3. REFERÊNCIAS

AGATHA, G.; VOIGT, A.; KAUF, E.; ZINTL, F. Conjugated linoleic acid modulation of cell membrane in leukemia cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 209, p. 87-103, 2004.

ALBRIGHT, C. D.; KLEM, E.; SHAH, A. A.; GALLAGHER, P. Breast cancer cell-targeted oxidative stress: enhancement of cancer cell uptake of conjugated linoleic acid, activation of p53, and inhibition of proliferation. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 79, p. 118-125, 2005.

ALONSO, L.; CUESTA, E. P.; GILLILAND, S. E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1941-1946, 2003.

ARAB, K.; ROSSARY, A.; SOULÈRE, L.; STEGHENS, J. P. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 96, p. 811-819, 2006.

ATAROD, E. B.; KEHRER, J. P. Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 37, n. 1, p. 36-47, 2004.

AZAIN, M. J.; HAUSMAN, D. B.; SISK, M. B.; FLATT, W. P.; JEWELL, D. E. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *Journal of Nutrition*, **Philadelphia**, v. 130, n. 6, p. 1548-1554, 2000.

-
- 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. **Clinical Nutrition**, Kidlington, v. 25, p. 454-465, 2006.
- BASSAGANYA-RIERA, J.; REYNOLDS, K.; MARTINO-CATT, S.; CUI, Y.; HENNIGHAUSEN, L.; GONZALEZ, F.; ROHRE, J.; BENNINGHOFF, A. U.; HONTECILLAS, R. Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 127, p. 777-791, 2004.
- BASU, S.; RISÉRUS, U.; TURPEIN, A.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. **Clinical Science**, London, v. 99, n. 6, p. 511-516, 2000.
- BASU, S.; SMEDMAN, A.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 468, p. 33-36, 2000.
- 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. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 257-260, 2003.
- BELURY, M.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; LIU, K. L.; VAN DEN HEUVEL, J. P. Dietary conjugated linoleic acid induces peroxisome-specific enzyme accumulation and ornithine decarboxylase activity in mouse liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 8, n. 10, p. 579-584, 1997.

-
- BENITO, P.; NELSON, G. J.; KELLY, D. S.; BARTOLINI, G.; SCHIMIDT, P. C.; SIMON, V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. **Lipids**, Champaign, v. 36, n. 3, p. 229-236, 2001.
- BENJAMIN, S.; HANHOFF, T.; BÖRCHERS, 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. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 107, p. 706-715, 2005.
- BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. Á.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 12, p. 2943-2948, 2000.
- BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos *Wistar*. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 561-565, 2005.
- BRODIE, A. E.; MANNING, V. A.; FERGUSON, K. R.; JEWELL DE HU, C. Y. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 33, p. 602-606, 1999.
- BROWN, J. M.; BOYSEN, M. S.; JENSEN, S. S.; MORRISON, R. F.; STORKSON, J.; LEA-CURRIE, R.; PARIZA, M.; MANDRUP, S.; MCINTOSCH, M. K. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, p. 1287-1300, 2003.

-
- BROWN, M.; EVANS, M.; MCINTOSH, M. Linoleic acid partially restores the triglyceride content of conjugated linoleic acid-treated cultures of 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 7, p. 381-387, 2001.
- BURR, G. O.; BURR, M. M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from diet. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 82, n. 2, p. 345-367, 1929.
- 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**, Champaign, v. 34, p. 833-839, 1999.
- CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HA, Y. L.; PARIZA, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 5, n. 3, p. 694-701, 1992.
- CHO, H. J.; KIM, E. J.; LIM, S. S.; KIM, M. K.; SUNG, M. K.; KIM, J. S.; PARK, J. H. Y. *Trans*-10, *cis*-12, not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 4, p. 893-898, 2006.
- CHOI, J. S.; JUNG, M. H.; PARK, H. S.; 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**, New York, v. 20, p. 1008-1017, 2004.
- CHOI, J.; JUNG, M.; PARK, H.; 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**, New York, v. 20, p. 1008-1017, 2004.

CHOI, Y. J.; KIM, Y. C.; HAN, Y. B.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulation stearyl-CoA desaturase gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 8, p. 1920-1924, 2000.

CHOUINARD, P. Y.; BAUMAN, B. A.; BAUMGARD, M. A. An update on conjugated linoleic acid. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FEED MANUFACTORY, 1999, Ithaca. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1999, p. 93-101.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids esters. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 23, n. 7, p. 1072-1074, 1982.

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 Letters**, Amsterdam, v. 202, p. 81-87, 2003.

CHUNG, S.; BROWN, J. M.; PROVO, J. N.; HOPKINS, R.; MCINTOSH, M. K.; Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte resistance through NF κ B-dependent cytokine production. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 46, p. 38445-38456, 2005.

CIMINI, A. M.; CRISTIANO, L.; COLAFARINA, S.; BENEDETTI, E.; DI LORETO, S.; FESTUCCIA, C.; AMICARELLI, F.; CANUTO, R. A.; CERÙ, M. P. PPAR γ -dependent effects of conjugated linoleic acid in the human glioblastoma cell line (ADF). **International Journal of Cancer**, New York, v. 117, p. 923-933, 2005.

CLÉMENT, L.; POIRIER, H.; NIOT, I.; BOCHER, V.; GUERRE-MILLO, M.; KRIEF, S.; STAELS, B.; BESNARD, P. Dietary *trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 43, p. 1400-1409, 2002.

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. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 4, p. 102-128, 2002.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, p. 622-630, 2001.

DE ROOS, B.; RUCKLIDGE, G.; REID, M.; ROSS, K.; DUNCAN, G.; NAVARRO, M. A.; ARBONES-MAINAR, J. M.; GUZMAN-GARCIA, M. A.; OSADA, J.; BROWNE, J.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. Divergent mechanisms of cis9, trans11 and trans10, cis12 conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 19, n. 12, p. 1746-1748, 2005.

DECKERE, E. A. M.; AMELSVOORT, J. M. M. V.; MCNEILL, G. P.; JONES, P. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 82, p. 309-317, 1999.

DEGNER, S. C.; KEMP, M. K.; BOWDEN, G. T.; ROMAGNOLO, D. F. Conjugated linoleic acid attenuates cyclooxygenase-2 transcriptional activity via an anti-AP-1

mechanism in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 2, p. 421-427, 2006.

EVANS, M. E.; BROWN, J. M.; McINTOSH, M. K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 9, p. 508-516, 2002.

EVANS, M.; GEIGERMAN, C.; COOK, J.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; MCINTOSH, M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosos in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 8, p. 899-910, 2000.

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 γ 2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, Champaign, v. 36, n. 11, p. 1223-1232, 2001.

FLINTOFF-DYE, N. L.; OMAYE, S. T. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 25, p. 1-12, 2005.

FRITSCH, J.; STEINHART, H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in german foods and evaluation of daily intake. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 206, n. 2, p. 77-82, 1998.

GAULLIER, J. M.; HALSE, J.; HOYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, p. 1118-1125, 2004.

GOTTLICHER, M.; WIDMARK, E.; LI, Q.; GUSTAFSSON, J. A. Fatty acid activate a chimeric of the clofibril acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 89, p. 4653-4657, 1992.

GRANLUND, L.; JUVET, L. K.; PEDERSEN, J. I.; NEBB, H. I. *Trans*¹⁰, *cis*¹²-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, p. 1441-1452, 2003.

GRINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 2000.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1881-1887, 1987.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Newly recognized anticarcinogenic fatty acid: identification and quantification in natural and processed cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, p. 75-81, 1989.

HA, Y. L.; STORKSON, J.; PARIZA, M. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated linoleic acid. **Cancer Research**, Baltimore, v. 50, p. 1097-1101, 1990.

HARGRAVE, K. M.; AZAIN, M. J.; KACHMAN, S. D.; MINER, J. L. Conjugated linoleic acid does not improve insulin tolerance in mice. **Obesity Research**, Silver Spring, v. 11, n. 99, p. 1104-1115, 2003.

HOUSEKNECHT, K. L.; VAN DEN HEUVEL, J. P.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; PORTOCARRERO, C. P.; PECK, L. W.; NICKEL, K. P.; BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 244, n. 3, p. 911-917, 1998.

HUBBARD, N. E.; LIM, D.; ERICKSON, K. L. Beef Tallow increases the potency of conjugated linoleic acid in the reduction of mouse mammary tumor metastasis. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 1, p. 88-93, 2006.

IP, C.; BRIGGS, S. P.; HAEGELE, A. D.; THOMPSON, H. J.; STORKSON, J.; SCIMECA, J. A. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1045-1050, 1996.

IP, C.; CHIN, F. C.; SCIMECA, J.; PARIZA, M. W. Mamary câncer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. **Cancer Research**, Baltimore, v. 51, p. 6118-6124, 1991.

ISABELLE, I.; GREEN, S. Activation of a member of steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, London, v. 347, p. 645-650, 1990.

JIANG, J.; WOLK, A.; VESSBY, B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, n. 1, p. 21-27, 1996.

KANG, K.; LIU, W.; ALBRIGHT, K. J.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Trans-10, cis-12 inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 303, n. 3, p. 795-799, 2003.

KELLEY, D. S.; TAYLOR, P. C.; NELSON, G. J.; SCHMIDT, P. C.; FERRETTI, A.; ERICKSON, K. L.; YU, R.; CHANDRA RK.; MACKEY B. E. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. **Lipids**, Champaign, v. 34, p. 317-324, 1999.

KEW, S.; GIBBONS, E. S.; THIES, F.; MCNEILL, G. P.; QUINLAN, P. T.; CALDER, P. C. The effect of feeding structured triacylglycerols enriched in eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids on murine splenocyte fatty acid composition and leucocyte phagocytosis. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 90, p. 1071-1080, 2003.

KIM, H. K.; KIM, S. R.; AHN, J. Y.; CHO, I. J.; YOON, C. S.; HA, T. Y. Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 51, p. 8-15, 2005.

KIM, J. H.; HUBBARD, N. E.; ZIBOH, V.; ERICKSON, K. L. Attenuation of breast tumor cell growth by conjugated linoleic acid via inhibition of 5-lipoxygenase activating protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 244-250, 2005.

-
- KUNIYASU, H. K.; YOSHIDA, K.; SASAKI, T.; SASAHIRA, T.; FUJII, K.; OHMORI, H. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. **International Journal of Cancer**, New York, v. 118, p. 571-576, 2006.
- 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. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1735, p. 30-40, 2005.
- LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 108, n. 1-2, p. 19-25, 1994.
- LEE, S. H.; YAMAGUCHI, K.; KIM, J. S.; ELING, T. E.; SAFE, S.; PARK, Y.; BAEK, S. J. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 27, n. 5, 972-981, 2006.
- LIEW, C.; SHUT, H. A. J.; CHIN, S. F.; PARIZA, M. W.; DASHWOOD, R. H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazol[4,5-f]quinolin-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 3037-3043, 1995.
- LIM, D. Y.; TYNER, A. L.; PARK, J. B.; LEE, J. Y.; CHOI, Y. H.; PARK, J. H. Y. Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21^{CIP1/WAF1}. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 205, p. 107-113, 2005.

- LIU, J.; SIDELL, N. Anti-estrogenic effect of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. **Breast Cancer Research and Treatment**, The Hague, v. 94, p. 161-169, 2005.
- LUI, O. A.; MAK, N. K.; LEUNG, K. N. Conjugated linoleic acid induces monocytic differentiation of murine myeloid leukemia cells. **International Journal of Oncology**, v. 27, p. 1737-1743, 2005.
- MACARULLA, M. T.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; ZABALA, A.; NAVARRO, V.; ECHEVARRIA, E.; CHURRUCA, I.; RODRIGUEZ, V. M.; PORTILLO, M. P. Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. **Nutrition**, New York, v. 21, n. 4, p. 521-529, 2005.
- MARTIN, J. C.; GRÉGOIRE, S.; SIESS, M. H.; GENTY, M.; CHARDIGNY, J. M.; BERDEAUX, O.; JUANÉDA, P.; SÉBÉDIO, J. L. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. **Lipids**, Champaign, v. 35, p. 91-98, 2000.
- MARTIN, S. A.; JENKINS, T. C. Factors affecting conjugated linoleic acid *trans*-C_{18:1} fatty acid production by mixed ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, 3347-3352, 2002.
- MASSO-WELCH, P. A.; ZANGANI, D.; IP, C.; VAUGHAN, M. M.; SHOEMAKER, S. F.; MCGEE, S. O.; IP, M. M. Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n.2, p. 299-307, 2004.

MCNEEL, R. L.; MERSMANN, H. J. Conjugated linoleic acid isomers influence porcine adipocyte differentiation in vitro. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 15, n. 5, p. 996, 2001.

MEDINA, E. A.; HORN, W. F.; KEIM, N.L.; HAVEL, P. J.; BENITO, P.; KELLY, D. S.; NELSON, G. J.; ERICKSON, K. L. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 7, p. 783-788, 2000.

MIGLIETTA, A.; BOZZO, F.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; TROMBETTA, A.; BELOTTI, S.; CANUTO, R. A. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signaling and mitochondrial pathway. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 234, p. 149-157, 2006.

MITCHELL, P. L.; LANGILLE, M. A.; CURRIE, D. L.; MCLEOD, R. S. Effect of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden hamster. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 3, p. 269-276, 2005.

MIYAZAWA, T.; TSUZUKI, T.; NAKAGAWA, K.; IGARASHI, M. Fatty acids with conjugated unsaturation: relationship between oxidative stability and physiological activities. **Lipid Technology**, High Wycombe, v. 17, n. 10, p. 221-225, 2005.

MOLONEY, F.; YEOW, T. P.; MULLEN, A.; NOLAN, J. J.; ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, p. 887-895, 2004.

MOUGIOUS, V.; MATSAKAS, A.; PETRIDOU, A.; RING, S., SAGREDOS, A.; MELISSOPOULOU, A.; TSIGILIS, N.; NIKOLAIDIS, M. Effect of supplementation with

conjugated linoleic acid in human serum lipids and body fat. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, n. 10, p. 585-594, 2001.

MOYA-CAMARENA, S. Y.; VAN DEN HEUVEL, J. P.; BLANCHARD, S. G.; LEESNITZER, L. A.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 40, p. 1426-1433, 1999.

MOYA-CAMARENA, S.; VAN DEN HEUVEL, J. P.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor α and β subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague-Dawley rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1436, p. 331-342, 1999.

MUNDAY, J. S.; THOMPSON, K. G.; JAMES, K. A. Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, p. 251-255, 1999.

NAGAO, K.; INOUE, N.; WANG, Y.; YANAGITA, T. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 310, p. 562-566, 2003.

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.

O'SHEA, M.; STANTON, C.; DEVERY, R. Antioxidant enzyme defence responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. **Anticancer Research**, v. 19, p. 1953-1960, 1999.

OCHOA, J.; FARQUHARSON, A. J.; GRANT, I.; MOFFAT, L. E.; HEYS, S. D.; WAHLE, W. J. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 125, n. 7, p. 1185-1191, 2004.

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R. F.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Dietary conjugated acid increases lean tissue and decreases fat deposition in growing pigs. **Journal of Nutrition, Philadelphia**, v. 129, n. 11, p. 2037-2042, 1999.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 223, n. 1, p. 8-13, 2000.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.

PARK, H. S.; CHO, H. Y.; HA, Y. L.; PARK, J. H. Y. Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 15, p. 229-235, 2004.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, Champaign, v. 32, p. 853-858, 1997.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M.; COOK, M. E.; SIH, C. J.; PARIZA, M. W. Inhibition on hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1486, n. 3, p. 285-292, 2000.

PARK, Y.; STORKSON, J. M.; NTAMBI, J. M.; COOK, M. E.; SIH, C. J.; PARIZA, M. W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 3, p. 235-241, 1999.

PETRIDOU, A.; MOUGIOUS, V.; SAGREDOS, A. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum and effect on body fat of women. **Lipids**, Champaign, v. 38, n. 8, p. 805-811, 2003.

POIRIER, H.; ROUAULT, C.; CLÉMENT, L.; NIOT, I.; MONNOT, M.C.; GUERREMILLO, M.; BESNARD, P. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. **Diabetologia**, New York, v. 48, p. 1059-1065, 2005.

POULOS, S. P.; SISK, M.; HAUSMAN, D. B.; AZAIN, M. J.; HAUSMAN, G. J. Pre and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 10, p. 2722-2731, 2001.

RAHMAN, S. M.; WANG, Y. M.; YOTSUMOTO, H.; CHA, J. Y.; HAN, S. Y.; INOUE, S.; YANAGITA, T. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, New York, v. 17, n. 5, p. 385-390, 2001.

RINGSEIS, R.; MÜLLER, A.; HERTER, C.; GAHLER, S.; STEINHART, H.; EDER, K. CLA isomers inhibit TNF α -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR γ ligand-like action. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1760, p. 290-300, 2006.

RISÉRUS, U. M.; ARNER, P.; BRISMAR, K.; VESSBY, B. Treatment with dietary *trans*10*cis*12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 25, n. 9, p. 1516-1521, 2002b.

RISÉRUS, U.; BASU, S.; JOVINGE, S.; FREDRIKSON, G. N.; ÄRNLÖV, J.; VESSBY, B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein. **Circulation**, Baltimore, v. 106, p. 1925-1929, 2002a.

RISÉRUS, U.; VESSBY, B.; ÄRNLÖV, J.; BASU, S. Effects of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 2, p. 279-283, 2004.

RITZENTHALER, K. L.; MCGUIRE, M. K.; FALEN, R.; SHULTZ, T. D.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M. A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 5, p. 1548-1554, 2001.

ROOS, B.; RUCKLIDGE, G.; REID, M.; ROSS, K.; DUNCAN, G.; NAVARRO, M. A.; ARBONES-MAINAR, J. M.; GUZMAN-GARCIA, M. A.; OSADA, J.; BROWNE, J.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. 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 Journal**, Bethesda, v. 29, p. 1-21, 2005.

RYDER, J. W.; PORTOCARRERO, C. P.; SONG, X. M.; CUI, L.; YU, M.; COMBATSIARIS, Y.; GALUSKA, D.; BAUMAN, D. E.; BARBANO, D. M.; CHARRON, M. J.; ZIERATH, J. R.; HOUSEKNECHT, K. L. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. **Diabetes**, New York, v. 50, n. 5, p. 1149-1157, 2001.

SAKONO, M.; MIYANAGA, F.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; FUKUDA, N.; WATANABLE, K.; IWATA, T.; SUGANO, M. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. **Lipids**, Champaign, v. 34, p. 997-1000, 1999.

SERGIEL, J. P.; CHARDIGNY, J. M.; SÉBÉDIO, J. L.; BERDEAUX, O.; JUANÉDA, P.; LOREAU, O.; PASQUIS, B.; NOEL, J. P. β -oxidation of conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in rats. **Lipids**, Champaign, v. 36, p. 1327-1329, 2001.

SIMON, E.; MACARULLA, M. T.; CHURRUCA, I.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; PORTILLO, M. P. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid prevents adiposity but not insulin resistance induced by a atherogenic diet in hamsters. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 2, p. 126-131, 2006.

SISK, M. B.; HAUSMAN, D. B.; MARTIN, R. J.; AZAIN, M. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, p. 1668-1674, 2001.

-
- SMEDMAN, A.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans-metabolic effects. **Lipids**, Champaign, v. 36, p. 773-781, 2001.
- SMEDMAN, A.; VESSBY, B.; BASU, S. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by α -tocopherol and cyclo-oxygenase-2 inhibitor. **Clinical Science**, London, v. 106, n. 1, p. 67-73, 2004.
- SONG, H. J.; SNEDDON, A. A.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. J. Induction of apoptosis and inhibition of NF- κ 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**, New York, v. 66, p. 839-846, 2006.
- 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. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 133, n. 3, p. 395-404, 2002.
- TANMAHASAMUT, P.; LIU, J.; HENDRY, L. B.; SIDELL, N. Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 674-680, 2004.
- TAYLOR, J. S. W.; WILLIAMS, R. R.; JAMES, P.; FRENNEAUX, M. P. Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 26, p. 307-312, 2006.
- TEACHEY, M. K.; TAYLOR, Z. C.; MAIER, T.; SAENGSIKISUWAN, V.; SLONIGER, J. A.; JACOB, S.; KLATT, M. J.; PTOCK, A.; KRAEMER, K.; HASSELWANDER, O.;

-
- HENRIKSEN, E. J. Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat. **Metabolism**, v. 52, n. 3, p. 1167-1174, 2003.
- TERPSTRA, A. H. M.; BEYNEN, A. C.; EVERTS, H.; KOCSIS, S.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 132, n. 5, p. 940-945, 2001.
- THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. **Medical Research**, v. 29, p. 392-396, 2001.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, New York, v. 49, n. 9, p. 1534-1542, 2000.
- TSUZUKI, T.; IGARASHI, M.; IWATA, T.; YMAUCHI-SATO, Y.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α -tocopherol. **Lipids**, Champaign, v. 39, n. 5, p. 475-480, 2004.
- VALEILLE, K.; FEREZOU, J.; AMSLER, G.; QUIGNARD-BOULANGE, A.; PARQUET, M.; GRIPOIS, D.; DOROVSKA-TARAN, V.; MARTIN, J. C. A cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. **American Journal of Physiology Heart Circulation**, v. 289, n. 2, p. 652-659, 2005.

-
- VAN DEN BERG, J. J. M.; COOK, N. E.; TRIBBLE, D. L. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. **Lipids**, Champaign, v. 30, p. 599-605, 1995.
- WEST, D. B.; DELANY, J. P.; CAMET, P. M.; BLOHM, F.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. Effects of conjugated linoleic acid on body composition fat and energy metabolism in the mouse. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 275, n. 3, p. 667-672, 1998.
- WHIGHAM, L. D.; O'SHEA, M.; MOHEDE, I. C. M.; WALASKI, H. P.; ATKINSON, R. L. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, p. 1701-1709, 2004.
- YAMASAKI, M.; IKEDA, A.; OJI, M.; TANAKA, O.; HIRAO, A.; KASAI, M.; IWATA, Y.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. **Nutrition**, New York, v. 19, n. 1, p. 30-35, 2003.
- YAMASAKI, M.; MANSO, K.; MISHIMA, H.; KIMURA, G.; SASAKI, M.; KASAI, M.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 6367-6371, 2000.
- YANG, L.; LEUNG, L. K.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y. Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3072-3076, 2000.

YURAWECZ, M. P.; SEHAT, N.; MOSSOBA, M. M.; ROACH, J. A. G.; KRAMER, J. K.G.; KU, Y. Variations in isomer distribution in commercially available conjugated linoleic acid. **Fett Lipid**, Leinfelden, v. 101, p. 277-282, 1999.

ZABALA, A.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; MACARULLA, T; SIMÓN, E.; RODRÍGUEZ, V. M.; NAVARRO, V.; PORTILLO, M. P. Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters. **Nutrition**, New York, v. 22, p. 528-533, 2006.

ZHANG, B.; GRAZIANO, M. P.; DOEBBER, T. W.; LEIBOWITZ, M. D.; WHITE-CARRINGTON, S.; SZALKOWSKI, D. M.; HEY, P. J.; WU, M.; CULLINAN, C. A.; BAILEY, P. Down-regulation of the expression of the obese gene by an antidiabetic thiazolidinedione in Zucker diabetic fatty rats and *db/db* mice. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271, n. 16, p. 9455-9459, 1996.

Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid
in Association with Vitamin E
and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

Lilia Ferreira Santos-Zago^{*}, Adriana Prais Botelho, and Admar Costa de Oliveira

Laboratory of Lipids, Department of Food and Nutrition, College of Food Engineering,
State University of Campinas, P.O. Box 6121, Brazil

Abstract: CLA has been studied for its beneficial effects on health. However, the possibility of adverse effects, such as increased oxidative stress, must also be considered. The present work aims to assess the effect of CLA supplementation on the process of lipid autoxidation, both in the presence and in absence of an antioxidant. The investigation consisted in a biological assay with 60 rats divided into six groups: C (control), CE (control+vitamin E), AE (AdvantEdge®CLA), AEE (AdvantEdge®CLA+Vitamin E), CO (CLA One®) and COE (CLA One®+vitamin E). The CLA amount was 2% of feed consumption. Animals were supplemented for 42 days. As indicators of lipid autoxidation, peroxide (IP), malondialdehyde (MDA), 8-iso-PGF₂ α isoprostane and catalase were determined. Hepatic IP results indicated that CLA increased oxidation: values for CLA-supplemented groups, particularly group CO (84.38 ± 10.97 mEq/kg), were higher than those of the control group (54.75 ± 9.70 mEq/kg). In contrast, serum MDA results showed that CLA reduces oxidation both for group AE (1.8 ± 0.67 mg of MDA/l) and for group CO (2.43 ± 0.61 mg of MDA/l) as compared to the control group (3.85 ± 0.24 mg of MDA/l). Serum catalase indicated a reduction of oxidation: groups AE and CO displayed 4734.23 ± 1078.93 kU/l and 5916.06 ± 2490.71 kU/l respectively. These values are significantly lower than those of the control group. An increase in 8-iso-PGF₂ α in urine was observed, particularly in group AE (95.13 ± 20.26 pg/ml) as compared to the control group ($69.46 \pm$

^{*}To whom correspondence should be addressed at Laboratory of Lipids, Department of Food and Nutrition, College of Food Engineering, State University of Campinas, Campinas, SP, P.O. Box 6121, Postal Code 13083-862, Brazil.

E-mail: lzago@fea.unicamp.br

16.65 pg/ml). It was concluded that the influence of CLA on lipid autoxidation is dependent on supplement type, supplement dosage and chosen indicator, including its tissue and determination methodology.

INTRODUCTION

Conjugated linoleic acids (CLA), a group of position and geometrical isomers with conjugated double bonds of the octadecadienoic acid (C18:2), is found in small amounts in a large variety of foods, and it is estimated that there are 56 possible isomers (1, 2).

Interest for conjugated linoleic acid (CLA) arose in 1979 when researchers found antimutagenic and anticarcinogenic substances, among them CLA, in grilled meats (3, 4). Subsequently, numerous works demonstrated other beneficial health effects of CLA, including body composition change, reduction of arteriosclerosis, prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus, enhancement of bone mineralization, immune system modulation, and antithrombogenic effect (1). Adverse effects of CLA supplementation have also been studied, particularly regarding increased susceptibility to lipid autoxidation (5, 6, 7, 8). CLA can be synthesized by ruminants by the biohydrogenation of unsaturated fatty acids by bacteria present in the rumen, in such a way that the predominant isomer is cis9, trans11 (9, 10). The cis9, trans11 CLA isomer can be produced in mammary glands by the delta 9 desaturase path. The trans10, cis12 isomer is also believed to be one of the isomers synthesized in the rumen of polygastric animals (11). Thus, significant concentrations of CLA, especially cis9, trans11 CLA, can be found in meats, milk, and their products (12).

Numerous commercial mixtures of CLA and its isomers have been studied for their physiological effects. The cis9, trans11 and the trans10, cis12 isomers have distinct biological activities. The trans10, cis12 isomer is more closely related to lipid and glucose

metabolism and body fat reduction (13), whereas the *cis*9, *trans*11 isomer is associated to antioxidant and anticarcinogenic effects (14, 15).

Although CLA physiological effects have been widely studied, some of them are not completely elucidated, and further investigation is needed, particularly concerning biological lipid oxidation (6, 7, 16).

With the aim of investigating the influence of CLA on the lipid oxidation process, many compounds with specific chemical structures that lend themselves to determination by various methods are used as biological indicators. They may result from autoxidation or from the action of enzymes (cyclooxygenases and lipoxygenases). Quantification of primary and secondary autoxidation products, such as peroxides and malondialdehyde respectively, or products of enzymatic oxidation such as 8-isoPGF_{2α} isoprostane, has been used to assess the degree of oxidative stress in biological systems subjected to CLA supplementation (6, 7, 8). The determination of the activity of antioxidant enzymatic systems such as catalase is also used as a parameter to evaluate biologic lipid oxidation in CLA assays (5). In view of a possible pro-oxidant action of CLA resulting from the fact that it is a conjugated diene, there is a hypothesis that its supplementation in association with the antioxidant protection provided by vitamin E could minimize the deleterious action of CLA on the process of biological lipid oxidation. Thus, the objective of the present study is to assess the effects of conjugated linoleic acid supplementation, both in the presence and in the absence of vitamin E, on the process of lipid autoxidation in healthy growing Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Supplements: Supplements used were linoleic acid 60 % Sigma (code L 1376), the conjugated linoleic acid commercial mixtures 75 % AdvantEdge[®] CLA (EASTM, Golden, CO, USA) and 75% CLA One[®] Free Fatty Acid Oil 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients, Gurnee, IL, USA), and DL- α -tocopherol acetate Ephynal[®] (Roche Brazil). Fatty acid composition of the linoleic acid supplement 60 % Sigma (code L 1376) and the commercial conjugated linoleic acid mixtures 75 % AdvantEdge[®], CLA (EASTM), and 75 % CLA One[®] Free Fatty Acid Oil 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients), expressed in g/100 g of fatty acids, can be seen in Table 1.

Animals and diets: For biological assays, albino male healthy recently weaned Wistar rats were used, aged 21 to 23 days, with a mean weight of 59.7 ± 5.84 g, from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, State University of Campinas. Animals remained in individual growth cages for 38 days, and in individual metabolic cages for 4 days for urine collection. They received water and feed *ad libitum*; temperature and humidity were kept in the ranges of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and 60-70 % respectively, and the light/dark cycle was of 12 hours. This work has been approved by the Animal Experiment Ethics Commission (CEEA - IB/UNICAMP, Protocol no. 564-1.). Diet was powdered AIN93G, prepared according to the American Society for Nutrition (17), with a protein concentration of 12% (18). The diet protein concentration was changed to 12% because this is a work on dietetic manipulation, and a diet with the original protein concentration would make it more difficult to observe the differences in animal growth that might result from CLA supplementation.

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

Table 1. Fatty acid composition of linoleic acid and commercial conjugated linoleic acid mixtures.

Fatty acids	Linoleic acid 60% Sigma (code L 1376)	Conjugated acid AdvantEdge® (EAS™)	linoleic 75% CLA	CLA One® Free Fatty Acid Oil 75% 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients)
g/100g of fatty acids				
C8:0	-	0.02		0.06
C10:1	-	0.01		-
C12:0	-	0.01		-
C14:0	0.13	-		-
C16:0 iso	0.02	-		-
C16:0	2.89	2.15		3.86
C16:1 cis-9	0.17	0.01		-
C17:0	0.04	0.03		-
C17:1	0.07	0.01		-
C18:0	0.80	2.96		1.91
C18:1 cis-9	25.90	13.23		16.86
C18:1 cis-11	2.06	1.04		0.94
C18:2 cis-9, cis-12	59.64	0.75		0.93
C18:2 cis-9, trans-11 CLA	0.09	40.12		36.81
C18:2 trans-10, cis-12 CLA	0.08	39.15		36.27
C18:2 cis-11 trans-13 CLA	-	-		1.44
C18:2 trans-11 cis-15	0.82	0.21		0.47
C18:3	-	0.06		0.13
C20:0	1.01	-		-
C20:1	-	0.06		0.13
C20:2	6.18	0.01		-
C20:3	-	0.04		-
C20:4	0.01	-		-
C20:5	0.01	0.02		0.03
C22:0	-	0.04		0.07
Total	100.00	100.00		100.00

CLA: conjugated linoleic acid

Experimental design: The biological assay experimental protocol was as follows. Sixty rats remained in an adaptation period for 7 days, receiving the respective diets and drinking water *ad libitum*. After this period, animals were randomly divided into 6 groups of 10 animals each in order to achieve body weight homogeneity within and across groups. Experimental groups were divided as follows: group C (control) received 60% linoleic acid; group CE received linoleic acid + DL- α -tocopherol acetate; group AE received AdvantEdge® CLA, group AEE received AdvantEdge® CLA + DL- α -tocopherol acetate;

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

group CO received CLA One[®] Free Fatty Acid Oil; and group COE received CLA One[®] Free Fatty Acid Oil + DL- α -tocopherol acetate. Supplement dosage was 2% of daily feed consumption, and DL-alpha-tocopherol acetate dosage was 30 mg/day. Animals were supplemented daily for 6 weeks. Body weight and food consumption were determined every two days. The following determinations were done: hepatic peroxide index (primary lipid autoxidation products), serum and hepatic malondialdehyde (secondary lipid autoxidation products), plasma and urine 8-iso-PGF₂ α isoprostane, and serum catalase activity. As described above, in the last 4 assay days animals remained in metabolic cages for urine collection. Lipid oxidation indicators were determined for 8 animals of each group, because that was the number of available metabolic cages. For blood determinations, 6 samples were used, as 2 were discarded due to hemolysis.

Supplementation: Animals were supplemented by orogastric intubation with 1 mL disposable syringes and *gavage* needles. The amount of supplement was calculated every other day on the basis of the average feed consumption of each group, so that supplementation followed normal feed ingestion. The amount of supplement varied from 0.25 a 0.49 mL and was calculated with help of the density. Supplements were aspirated with the syringe and kept away from light till the moment of administration. For the groups receiving DL- α -tocopherol acetate, this product was aspirated into the syringe before linoleic acid and conjugated linoleic acid supplements, and administered with the same syringe. Rats were removed group by group from the experiment room, placed in plastic boxes, and taken to the supplementation room. This procedure was done daily during daytime and always at the same time, since rodent have nocturnal habits.

Determination of fatty acid profiles of linoleic acid and conjugated linoleic acid mixtures: Methylation followed the Christie method (19). About 50 g of each sample were

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

weighed in conic bottom graduated extraction tubes. Then 2 mL of 1 % methanolic sulphuric acid were added. Tubes were capped and shaken in an electric agitator for 1 minute. Tubes remained in water bath for 2 hours; 5 mL of sodium chloride 5 % were added, followed by 1 minute shaking. 5 mL of hexane were added, and tubes were again shaken for 30 seconds. The supernatant (hexane and methyl ester) was transferred to another extraction tube to which 4 mL of 5 % potassium bicarbonate were added. Tubes were shaken in an electric agitator for 1 minute, and phase separation occurred rapidly. The new supernatant was transferred to another extraction tube containing 1 g of sodium sulphate. The hexane was evaporated with help of a nitrogen flux under water bath at 40 °C. Finally, 2 mL of hexane were added, and the solution was transferred to a chromatography vial, labeled, and stored at -20 °C. Fatty acid profile was determined by gas chromatography with a capillary silica column CP SIL 88 (0.25 mm x 0.2 µm x 100 m) and a fire ionization detector (FID). A temperature gradient with initial temperature of 70 °C was used for 4 minutes, followed by an increase at the rate of 13 °C/min until 175 °C; after 27 min the temperature was raised again at the rate of 4 °C/min, to 240 °C where it remained for 4 minutes, totalizing 70 min for the whole run. Injector and detector temperatures were 250 and 300 °C respectively. Injection was in split mode with a ratio of 50:1. Drag gas was hydrogen with a flux of 1.8 mL/min, and pressure of 36.3 psi at the column head (20). Results were expressed in percentage of total fatty acids. The standard adopted was CRM-164 (Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), which has certified values for 11 fatty acids; they were used to establish the correction factor for each certified fatty acid in order to transform the peak expressed in percentage of area into mass (mg/g total fatty acids).

Collection of serum and plasma from blood and urine of animals for determination of

lipid autoxidation indices: Blood of animals was collected under anaesthesia (sodium pentobarbital - Hypnol 3%, 46 mg/kg), by cardiac puncture after a 12-hour fast at the end of each experiment. Blood samples were collected with 10 mL syringes and gently poured, without the needle, down the walls of polyethylene tubes, without anticlotter for serum, and with anticlotter for plasma. Tubes remained in water bath at 37 °C for 30 min, and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. After that, supernatant serum and plasma were separated with a pipette, and stored in polypropylene microtubes in an Ultra Low Freezer at -80 °C until analysis. Urine was collected in 25 mL graduated cylinders with 1 mL of 20% sulfuric acid, kept for a period of 24h, filtered, and stored at - 80°C until analysis.

Peroxide index (primary lipid autoxidation products): For the determination of the peroxide index, lipids were previously extracted from the liver of each rat by the method of Bligh; Dyer (21) with some modifications due to sample peculiarities. About 1 g of sample was homogenized in 5 mL of chloroform, 10 mL of methanol, and 4 mL of water, followed by continual rotary agitation for 30 minutes. After this, 5 mL of chloroform and 5 mL of 1.5 % sodium sulphate aqueous solution were added, and the sample was vigorously and continually shaken for 2 minutes. After dilution and complete separation of phases, the upper methanol layer containing water and non-lipid compounds was aspirated, and the lower chloroform layer containing total lipids was filtered in quantitative paper filter to obtain a clear solution. Immediately after lipid extraction, peroxide index determination was performed according to the official AOAC method (22), which is based on the oxidation of iodine in the presence of potassium iodide by the peroxide present in the sample, assuming that all oxidizing substances in the sample are peroxides. For the

computation of the peroxide index, the amount of lipids present in the chloroform solution resulting from the lipid extraction procedure of Bligh; Dyer (21) was used.

Malondialdehyde - MDA (secondary lipid autoxidation products): Determination of thiobarbituric acid reactive substances was done for serum and liver of each animal using about 1.5 mL and 0.2 g of samples respectively, in triplicate. The method chosen for this analysis was proposed by Sinnhuber; Yu (23), and its basic principle is the formation of a pink-red pigment composed of 2 molecules of thiobarbituric acid and 1 of malondialdehyde (MDA). Its absorbance was read in visible light of 535 nm wavelength, using a 1 % solution of 2-thiobarbituric acid for calibration; results were expressed in mg malondialdehyde per kg of sample.

Determination of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane: Determination of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane in plasma and urine of the rats was done by enzyme immunoassay using a commercial kit from Cayman Chemical, catalog number 516351. The method is based in the competition between 8-iso-PGF_{2α} isoprostane and conjugated 8-iso-PGF_{2α} isoprostane-acetylcholinesterase (marker) by a limited number of binding sites for the specific antiserum of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane. Results were expressed in pg/mL of sample.

Catalase activity determination: For the catalase activity determination, the methodology described by Góth (24) was used. It consists in the determination of serum catalase by the reaction with hydrogen peroxide. Determination was performed as follows: 0.2 mL of serum were incubated in substrate solution composed of hydrogen peroxide (65 μmol) in phosphate buffer (60 mmol/L, pH 7.4), for 1 minute at 37°C. After the incubation period, the reaction was interrupted by adding 1.0 mL of ammonium molybdate (32.4 mmol/L). Absorbance of the yellow complex formed between ammonium molybdate and hydrogen peroxide was read at 405 nm. Results were expressed in kU/L, considering that one unit of

*Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in
Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats*

catalase decomposes, in the conditions described above, 1 mmol of hydrogen peroxide per minute.

Statistical analysis: Results are expressed as means $\pm$ SD. Data were analysed statically by ANOVA using Statistical Analysis System (25) to test the effect of CLA mixtures and the interaction between CLA mixtures and vitamin E. The effect of supplementation time on food consumption and growth was also examined. The Tukey test was used to test the differences among groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

With regard to feed consumption, weight gain and food efficiency, Table 1 shows that differences were found only between groups CE and AE ($P \leq 0.05$). Figure 1 represents the weight gain curve and feed consumption of the rats during the period of CLA supplementation, and shows that growth was normal.

Table 2. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of feed consumption, weight gain and feed efficiency of experimental and control groups over the six week intervention period.

Groups	Consumption (g)	Weight gain (g)	Feed efficiency
C	631.2 $\pm$ 48.7 ^{a,b}	192.5 $\pm$ 27.2 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
CE	589.6 $\pm$ 41.0 ^b	166.3 $\pm$ 14.2 ^b	0.28 $\pm$ 0.01 ^b
AE	645.7 $\pm$ 27.6 ^a	203.5 $\pm$ 17.9 ^a	0.31 $\pm$ 0.01 ^a
AEE	641.9 $\pm$ 55.4 ^{a,b}	194.6 $\pm$ 27.2 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
CO	621.9 $\pm$ 30.9 ^{a,b}	187.0 $\pm$ 10.4 ^{a,b}	0.30 $\pm$ 0.01 ^{a,b}
COE	633.3 $\pm$ 53.8 ^{a,b}	195.2 $\pm$ 22.7 ^a	0.31 $\pm$ 0.01 ^a

Values not sharing similar letter in the same column are different ($p \leq 0.05$) in the Tukey test.

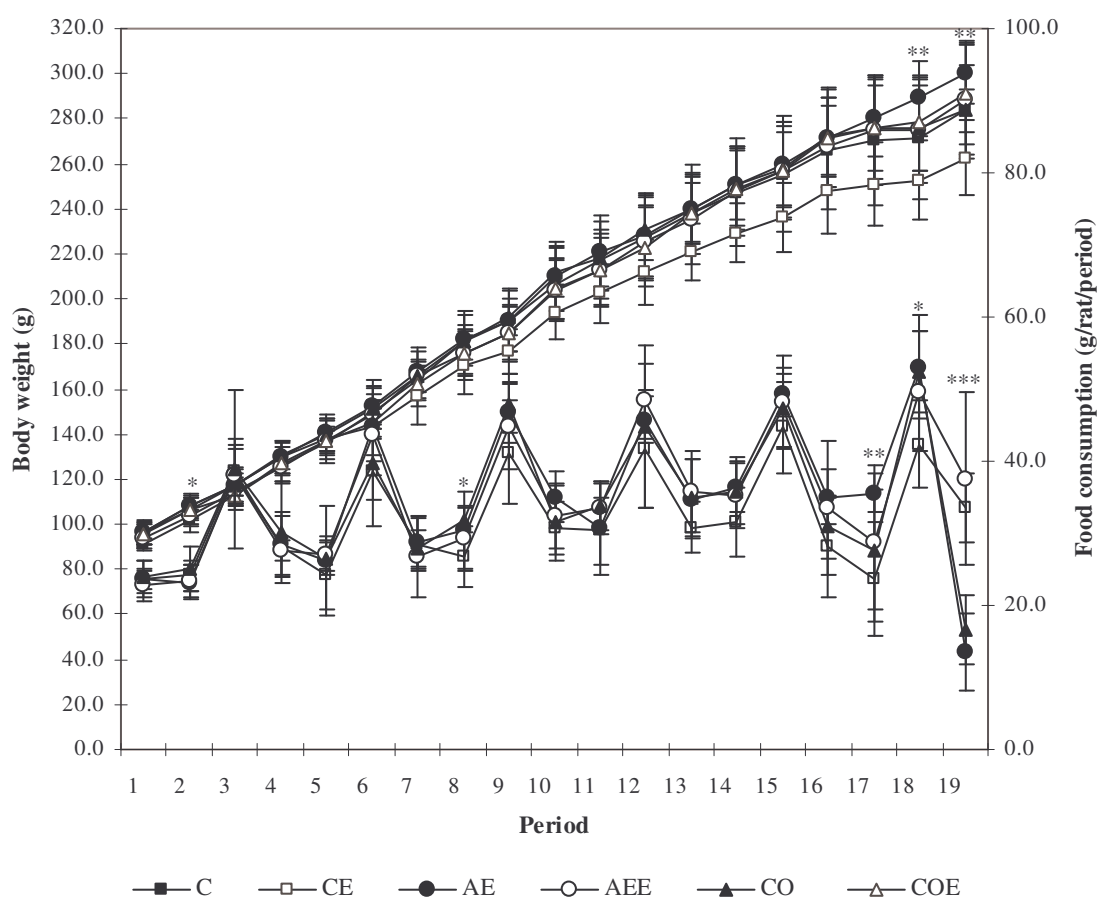


Figure 1. Body weight (g) and food consumption (g/rat/period) in control and experimental groups (n=10).

Upper lines represent mean weight values (g); lower lines represent mean food consumption (g) in a period of two days. C: control group; CE: control group with vitamin E; AE: group supplemented with AdvantEdge® CLA; AEE: group supplemented with AdvantEdge® CLA + vitamin E; CO: group supplemented with One® CLA; COE: group supplemented with One®CLA + vitamin E. * statistical difference between group CO and group C, and ** statistical difference between group CE and groups AE and COE for body weight according to Tukey test ($P \leq 0.05$); statistical difference between group CE and groups C and CO, ** statistical difference between AE and groups C and CE and *** statistical difference between groups C, AE and CO, and groups CE, AEE and COE for food consumption according to Tukey test ($P \leq 0.05$).

With regard to effects of CLA on lipid autoxidation, it can be said that results obtained are in agreement with the literature, i.e., there is no consensus about the real effect of this supplement on the oxidation process of biological lipids: many of the results point to the investigation of antioxidant properties, and others to the investigation of a possible pro oxidant effect of CLA. In Table 3, the results of all lipid oxidation indicators determined in this experiment are described. There was a difference in hepatic peroxide index (IP) only between groups C and CO. Group CO did exhibit a higher IP value than group C ($P \leq 0.05$), which might suggest that the CLA One[®] supplement had a more discernible influence on the process of biological lipid oxidation as compared with the AdvantEdge[®] CLA supplement, since the group of rats receiving the latter displayed a mean peroxide value similar to the control group, and smaller than group CO. Serum malondialdehyde average values were significantly smaller in groups receiving CLA supplementation, both for CLA One[®] and AdvantEdge[®] CLA ($P \leq 0.05$). Hepatic MDA values did not differ between the control group (13.50 ± 3.23 mg/kg of sample) and groups receiving supplementation: AE (12.51 ± 2.41 mg/kg of sample) and CO (14.26 ± 0.71 mg/kg of sample). However, group AEE, which received CLA supplementation associated to vitamin E, exhibited significantly lower values ($P \leq 0.05$). Regarding the 8-iso-PGF₂ α isoprostane results, differences in plasma values were observed only between groups AE and COE ($P \leq 0.05$). 8-iso-PGF₂ α isoprostane values in urine for group AE were significantly higher, whereas for group CO values were significantly lower than for controls ($P \leq 0.05$). Such results suggest that effects on the lipid autoxidation process can be different as a result of the characteristics of each supplement. Supplements used in the present research contained 79.27 % and 73.08 % de CLA for the brands AdvantEdge[®] CLA e CLA One[®],

respectively, and the proportion between the predominant isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 was approximately 1:1. The mean values expressing catalase activity were significantly lower ($P \leq 0.05$) in the groups receiving CLA, with the exception of group CO. These findings suggest the possibility of an antioxidant effect of CLA, as this enzyme plays a major role in protecting the organism against damage of oxidative stress by means of the degradation of peroxides which result from lipid oxidation.

Table 3. Mean values $\pm$ standard deviation of the hepatic peroxide index (n=8), serum (n=6) and hepatic (n=8) malondialdehyde (MDA), plasma and urine 8-iso-PGF₂ α isoprostane (n=6) and serum catalase activity (n=6) in control and experimental groups.

Groups	Peroxide index* mEg/kg	MDA mg MDA/kg		8-iso-PGF2 α isoprostane pg/ml		Serum Catalase kU/l
		Serum	Liver*	Plasma	Urine	
C	54.75± 9.70 ^a	3.85±0.24 ^a	13.50±3.23 ^a	13.84±3.55 ^{ab}	69.46± 16.65 ^a	10496.52±5121.84 ^a
CE	67.39±11.26 ^{ab}	2.43±1.32 ^b	11.89±3.96 ^a	15.29±7.14 ^{ab}	24.37± 4.54 ^b	3827.68±1131.79 ^b
AE	53.66±13.55 ^{ab}	1.80±0.67 ^b	12.51± 2.41 ^a	18.86±3.41 ^a	95.13± 20.26 ^c	4734.23±1078.93 ^b
AEE	76.16±36.47 ^{ab}	1.64±0.71 ^b	6.73± 3.45 ^b	13.54±2.84 ^{ab}	73.03± 9.15 ^a	3228.14±1567.98 ^b
CO	84.38±10.97 ^b	2.43±0.61 ^b	14.26±0.71 ^a	13.72±2.34 ^{ab}	54.50± 13.81 ^d	5916.06±2490.71 ^{ab}
COE	72.03±14.12 ^{ab}	2.17±0.42 ^b	13.46±2.12 ^a	10.17±1.62 ^b	49.88± 5.51 ^d	3645.86±2178.95 ^b

Values not sharing similar letter in the same column are different ($P \leq 0.05$) in the Tukey test.

* Values expressed in dry basis.

C: control group; CE: control group with vitamin E; AE: group supplemented with AdvantEdge[®] CLA; AEE: group supplemented with AdvantEdge[®] CLA + vitamin E; CO: group supplemented with One[®] CLA; COE: group supplemented with One[®] CLA + vitamin E.

DISCUSSION

Regarding feed consumption and weight gain of the rats during the supplementation period, it can be said that, even though differences between some of the groups were observed at certain moments, growth was normal. Feed consumption changes seen in the graph are a consequence of supplement amount correction. The administered concentration of CLA followed the feed consumption, i.e., as consumption rose, supplement quantity was raised, leading to a drop in feed consumption, because CLA, as a lipid, produced greater satiety in the rats. This occurred cyclically throughout the assay, but it is important to note that these oscillations did not compromise animal growth, as seen in the body weight curves (Figure 1).

Regarding results on the influence of CLA on biological lipid oxidation, a point to be discussed is that PI results of a preliminary assay in our laboratory (26) represent a fairly strong indication of an increase of this indicator in groups receiving CLA supplementation, and those results were higher than in the present assay. The main objective of the previous assay was to standardize CLA supplementation conditions. Growing male Wistar rats were supplemented for 21 days with commercial conjugated linoleic acid mixture 75 % AdvantEdge[®], CLA (EASTM) in the concentrations of 1%, 2% and 4% of the daily feed consumption, having linoleic acid as a control. The concentration adopted for the present assay -- 2% of feed consumption -- was chosen on the basis of results and operational conditions of supplementation in the preliminary assay. As discussed above, the PI concentration in the present assay was higher. This observation might be explained by the duration of supplementation, which was greater in the present assay, coupled to the fact that peroxides are primary products of lipid oxidation, i.e., as supplementation time increases

peroxide concentration diminishes due to their cleavage into secondary products. This hypothesis can be confirmed by the results of malondialdehyde (MDA) shown in Table 3. Although there was no significant difference ($P > 0.05$) between control groups and those receiving CLA without vitamin E (hepatic values), mean serum and hepatic values of malondialdehyde (MDA), a representative of secondary lipid oxidation, are higher in the present assay, in which supplementation ran for a period twice as long as the previous assay (26). Results reported above are in agreement with works regarded as crucial for the reinvestigation of CLA effects on the lipid autoxidation process. Studies such those by Cantwell et al. (5), Basu; Smedman; Vesby (6), and Yamasaki et al. (7), which aimed at assessing the effect of CLA on lipid autoxidation, clearly point to the need of reinvestigating the antioxidant properties and the possible pro-oxidant effect of CLA.

The IP and MDA results of the present work are different from those reported by some research teams that studied antioxidant and pro-oxidant properties of CLA. The previously mentioned works (5, 6, 7) found MDA results that led to the conclusion that CLA acts as a pro-oxidizing agent. In a more recent work on the effect of CLA on low-density lipoprotein oxidation, Flintoff-Dye; Omaye (27) demonstrated that the four isomers under study (cis-9, trans-11; trans-10, cis-12; trans-9, trans-11; and cis-9, cis-11) promoted a significant increase of TBARS concentration in the samples.

Regarding 8-iso-PGF_{2α} isoprostane, a product of non-enzymatic lipid oxidation and, according to the literature, the most specific biological indicator for the assessment of oxidative stress, results showed that when it was determined in the urine, AE supplement increased oxidation, whereas CO reduced it. Since the identification in the 1990s of series F prostaglandins, particularly 8-iso-PGF_{2α} isoprostane, as fairly specific indicators of lipid autoxidation (28), many studies aimed at assessing oxidative stress by its determination in

different experimental models, including humans. Works evaluating the influence of CLA on oxidative stress using series F prostaglandin determinations as indicators were published only recently and are still scarce. Basu et al. (29), supplementing humans with abdominal obesity with CLA for one month, found urinary values of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane significantly higher than the group receiving placebo, and these values returned to basal levels after conclusion of CLA supplementation. In 2000, Basu; Smedman; Vessby (6) categorically stated that CLA induces lipid peroxidation in humans after finding a significant increase of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane in urine, about four times higher than basal, after supplementation with 4.2 g of CLA for 12 weeks.

There is an ongoing debate about the action of a specific CLA isomer in promoting a certain physiological effect, such as the case of total body fat reduction, one of the most widely studied effects of CLA, and promoted mainly by the trans-10, cis-12 (30) isomer. There is no information about which isomer is responsible for influencing lipid autoxidation in the studies of CLA and oxidative stress. It is believed that this influence is promoted by both predominant isomers, cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 (27). In order to investigate whether the process of biological lipid oxidation is influenced by a specific isomer, Risérus et al. (31) supplemented men bearing metabolic syndrome with 6 capsules of 3.4 g per day of CLA isomer mixture, and the isolated isomer trans-10, cis-12 for a period of 12 weeks. The authors found urine values of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane 25 times higher in men receiving supplementation with a mixture of CLA than in the control group. This led to the conclusion that biological lipid oxidation is influenced by CLA, and that pure trans-10, cis-12 isomer had a more potent influence the oxidation on the oxidation process. Similar results are reported in the work of Smedman; Vessby; Basu (32), which aimed at understanding the mechanism by which CLA influences the oxidation process,

and whether this influence is promoted by a specific CLA isomer. In a double-blind randomized study, Risérus et al. (8) supplemented obese men for a period of 12 weeks with 3 g/day of CLA mixture containing predominantly the cis-9, trans-11 isomer. Urine concentration of 8-iso-PGF_{2α} isoprostane was 50 % higher after supplementation with the CLA isomer, indicating that lipid oxidation is increased not only by isomer trans-10, cis-12 but by cis-9, trans-11 as well. Although this was not the only isomer in the mixture, it corresponded to 83 % of it. Flintoff-Dye; Omaye (27) assessed the antioxidant and pro-oxidant properties of the CLA isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 by means of the determination of LDL in human blood samples. Results indicated that both isomers influenced the lipid oxidation process in a similar way. Based on the phenomenon of hormesis, that characterizes the change in effect according to the dosage (33), the authors point out that CLA acts in a paradoxical way, in that it initially acts as a pro-oxidant (in low concentrations), then as an antioxidant (in intermediate concentrations), and finally as pro-oxidant again (in high concentrations), but they go on to conclude that, in general, CLA is a pro-oxidant agent because of the increase of oxidative stress observed in low concentrations, when an antioxidant effect would be expected.

The lower catalase activity would indicate smaller peroxide production, which in turn would indicate a lower degree of oxidative stress. In a work by Cantwell et al. (5) aiming at assessing the effect of CLA on the enzymatic system of antioxidant defence in hepatic cells of rats, it was demonstrated that CLA promoted a significant reduction of catalase activity when hepatocytes were exposed to a higher concentration (20 ppm). These results led to the conclusion that CLA could act as an antioxidant; however, the authors point to the need of investigating long-term exposure to CLA. Catalase (EC 1.11.1.6, CAT), a tetrameric heme protein, is present in most aerobic cells, and is predominantly

found in peroxisome, a cell organelle where oxidation of long-chain and very-long-chain fatty acids takes place. Peroxisome beta-oxidation results in the production of hydrogen peroxide (H_2O_2), a catalase substrate.

The above discussion of results can be supported by the influence of CLA on the expression of transcription factors, such as peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), particularly PPAR α and PPAR γ . Research works seeking to understand the action of CLA as activator or inhibitor of these nuclear receptors are somewhat conflicting, since both activation (34, 35) and inhibition (36, 37) are reported. Interpreting results of the present work on the assumption that CLA acts as a PPAR α ligand, as shown by Moya-Camarena et al. (34), does not seem consistent, since the increase of PPAR α expression would cause an increase in mitochondrial and peroxisome oxidation of fatty acids, and consequently an increase in H_2O_2 production, leading to increased catalase activity, and this was not observed in the present research. On the other hand, looking at the same results considering the findings of Kang et al. (36) and Granlund et al. (37), who demonstrated that CLA inhibits PPAR γ expression, it can be said that the results of the present work are consistent. This seems to be confirmed by the work of Girnun et al. (38), which suggests that the increase in PPAR γ expression can increase catalase activity. Assuming that this relation is inversely proportional, a possible PPAR γ inhibition by CLA could lead to a decrease in catalase activity, as observed in the present research.

A further objective of this study was to assess the possibility of associating CLA administration to an antioxidant protection by means of a concomitant supplementation with DL- α -tocopherol acetate. It is widely accepted that supplementation with antioxidants, particularly α -tocopherol, reduces oxidative stress (39), although there is some controversy.

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

In recent years the scientific community has developed a new outlook about antioxidant supplementation, as a result of some evidence of adverse effects involving increased susceptibility to some diseases such as cancer and cardiovascular diseases. As a matter of fact, concerning cardiovascular diseases, the Dietary Guidelines of the American Heart Association say that there is no positive support for using antioxidant supplements in order to reduce the risk of cardiovascular diseases (40, 41).

There are practically no studies of CLA administered concomitantly with antioxidant protection, perhaps because there is a controversy surrounding its antioxidant properties (42, 43). Results obtained in the present study showed that CLA supplementation concomitant with vitamin E did not significantly reduce lipid oxidation ($P > 0.05$). The group receiving supplementation of CLA One[®] + DL α -tocopherol acetate (group COE) did not display values different from the group receiving CLA mixture only (group CO) in any of the parameters under study. However, the group receiving AdvantEdge[®] CLA + DL- α -tocopherol acetate (group AEE) had lower values ($P \leq 0.05$) for hepatic TBARS and urinary 8-iso-PGF₂ α isoprostane. It is widely known in the scientific community that vitamin E is one of the most potent antioxidants; however, factors such antioxidant dosage and bioavailability, and degree of exposure of the organism to oxidative stress must be taken into account. In a review by McCall; Frei (39), the real action of antioxidant compounds, including vitamin E, in the reduction of damage caused by oxidative stress was discussed. After considering the population, supplementation duration and dosage, lipid oxidation indicators and their determination methods, and the endpoints determined in the reviewed studies, the authors reported that vitamin E can protect the organism against lipid oxidation, but only in very high concentrations, far beyond the daily recommended values. The authors were led to conclude that further research is needed in order to clarify many

doubts still surrounding the efficiency of antioxidant vitamin supplementation for oxidative stress prevention. From results of the present study, some hypotheses can be discussed in order to understand the low efficiency of vitamin E supplementation on most of the determined indicators, in addition to a possible inefficiency of antioxidant supplementation in some situations:

Supplement dosage: The amount of DL- α -tocopherol acetate used in this work was 30 mg/day, a relatively high amount compared to values recommended by AIN93G (17), namely, 75 mg/kg of diet. According to this recommendation, the daily consumption of vitamin E through diet for the rats in the present experiment would be in the range of 1.5 to 3 mg (taking into account the feed consumption variation during the experimental period: 20 to 40 g/day). It should be pointed out that the amount of DL- α -tocopherol acetate used in the assay was chosen on the basis of previous works of this laboratory. In view of the above, it is plausible that the amount of supplement might have been excessive, preventing the detection of any difference that might exist among groups, since there is a debate about the inefficiency of even the adverse result of excessive supplementation. This hypothesis is based on the concept of the previously mentioned phenomenon of hormesis, which has already been documented for many compounds, including vitamins (33).

Exposure to oxidative stress: It is important to point out that one of the objectives of the present research, based on the chemical structure of CLA, was to gather information to clarify the supposition that this supplement has a pro-oxidative effect. Thus, rats would be exposed to a pro-oxidative agent, and from this, protection of vitamin E against this agent would be assessed, since it can increase oxidative stability of unsaturated fatty acids with conjugated double bonds (44). However, although the issue is still unresolved, there is a hypothesis that CLA acts as an antioxidant agent (42, 43), which would explain the

results, as the rats would not have been so exposed to oxidative stress. Such a hypothesis would also lend some support to the conclusion that, if CLA really has an antioxidant effect, this effect is not enhanced by the presence of vitamin E.

CONCLUSIONS

After examining the results of IP, MDA and 8-iso-PGF₂ α isoprostane, we conclude that the influence of conjugated linoleic acid on lipid oxidation, as measured by these indicators, depends on the CLA supplement type. Mean values expressing serum catalase were significantly lower in CLA supplemented groups, with or without vitamin E, than in the control group, suggesting antioxidative activity. The efficiency of vitamin E supplementation, particularly for the control group for the indicators catalase and 8-iso-PGF₂ α isoprostane, should be highlighted. Thus, the results of lipid autoxidation indicators are uncertain, but did warrant the conclusion that supplementation with conjugated linoleic acid influenced the process of biological lipid oxidation in different ways, and the influence is dependent on supplement type and the autoxidation indicator used, including its tissue and determination method.

Acknowledgments: To Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Process 2003/07648-4); to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process 133874/2003-6) for the financial support, and to researcher BOTELHO, A.P, respectively; and to the Laboratory of Natural Products, Institute of Biology, State University of Campinas for technical assistance.

REFERENCES

1. Salas-Salvadó, J., Marquez-Sandoval, F. and Bulló, M. (2006) Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effects on body composition, glucose, and lipid metabolism, *Crit. Rev. Food Sci.* 46, 479-488.
2. Yurawecz, M.P., Sehat, N., Mossoba, M.M., Roach, J.A.G., Kramer, J.K.G. and Ku, Y. (1999) Variations in isomer distribution in commercially available conjugated linoleic acid, *Fett/Lipid* 101, 277-282.
3. Pariza, M. W., Ashoor, S. H., Chu, F. S. and Lund, D. B. (1979) Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger, *Cancer Letter* 7, 63.
4. Pariza, M. W. and Hargraves, W. A. (1985) A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis* 6, 591.
5. Cantwell, H., Devery, R., O'shea, M. and Stanton, C. (1999) The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes, *Lipids* 34, 833-839.
6. Basu, S., Smedman, A. and Vessby, B. (2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans, *FEBS Letters* 468, 33-36.
7. Yamasaki, M., Mansho, K., Mishima, H., Kimura, G., Sasaki, M., Kasai, M., Tachibana, H. and Yamada, K. (2000) Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid on Lipid Peroxidation and Histological Change in Rat Liver Tissues, *J. Agr. Food Chem.* 48, 6367-6371.

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

8. Risérus, U., Vessby, B., Ärnlov, J. and Basu, S. (2004) 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.* 80, 279-283.
9. Parodi, P. W. (1977) Conjugated octadecadienoic acids of milk fat, *J. Dairy Sci.* 60, 1550-1553.
10. Oustrowska, E., Walker, G.P., Doyle, P.T. and Dunshea, F.R. (2004) Milk conjugated linoleic and trans-vaccenic acids are highest in Spring in grazing cows, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 13(Suppl.), S53.
11. Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A. and Griinari, J.M. (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants, *Proc Am. Soc. Anim. Sci.* Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.
12. Corl, B.A., Baumgard, L.H., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Philips, B.S. and Bauman, D.E. (2001) The role of delta-9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11, *J. Nutr. Biochem.* 12, 622-630.
13. Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J. and Pariza, M.W. (1999) Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice, *Lipids* 34, 235-241.
14. Park, H.S., Cho, H.Y., Ha, Y.L. and Park, J.H.Y. (2004) Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats, *J. Nutr. Biochem.* 15, 229-235.
15. Tanmahasamut, P., Liu, J., Hendry, L.B. and Sidell, N. (2004) Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells, *J Nutr.* 134, 674-680.

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

-
16. Munday, J. S., Thompson, K. G. and James, K. A. (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model, *Brit. J. Nutr.* 81, 251-255.
17. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. and Fahey, G. C. Jr. (1993) AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr.* 123, 1939-1951.
18. Goena, M., Mazo, F., Fernández-González, L., Tosar, A., Fruhbeck, G. and Santidrián, S. (1989) Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats, *Rev. Esp. Fisiol.* 45, 55-60. Supplement.
19. Christie, W. W. (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters, *J. Lipid Res.* 23, 1072-1074.
20. Sehat N., Kramer J. K., Mossoba M. M., Yurawecz M. P., Roach J. A. G., Eulitz K., Morehouse K. M. and Ku Y. (1998) Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences, *Lipids* 33, 963-971.
21. Bligh, E. G.; Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
22. Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. *Official methods of analysis*. 16. ed. CUNNIF, P., ed. Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1.
23. Sinnhuber, R. O. and Yu, T. C. (1958) 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde, *Food Technol.* 12, 9-12.

24. Góth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin. Chim. Acta* 196, 143-152.
25. Sas Institute Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary: USA inst., 2003
26. Santos-Zago, L.F.; Botelho, A.P.; Reis, S.M.P.M.; Oliveira, A.C. Effect of conjugated linoleic acid on lipid autoxidation in Wistar rats. *Anais do 3 Simpósio em Ciência de Alimentos*, Florianópolis, v. 3, 2005.
27. Flintoff-Dye, N. L. and Omaye, S. T. (2005) Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins, *Nutr. Res.* 25, 1-12.
28. Roberts; L. J. and Morrow, J. D. (2000) Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo, *Free Radical Bio. Med.* 28, 505-513.
29. Basu, S., Risérus, U., Turpeinen, A. and Vessby, B. (2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity, *Clin Sci*, 99, 511-516.
30. Park., Y., Storkson, J. M., Albright, K. J., Liu, W., Pariza, M. W. (1999) Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice, *Lipids* 34, 235-241.
31. Risérus, U., Basu, S., Jovinge, S., Fredrikson, G. N., Ärnlov, J. and Vessby, B. (2002) Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein – a potencial link to fatty acid-induced insulin resistance, *Circulation* 106, 1925-1929.
32. Smedman, A., Vessby, B. and Basu, S. (2004) Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by α -tocopherol and cyclooxygenase-2 inhibitor, *Clin. Sci.* 106, 67-73.

Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats

33. Calbrese, E. J. and Baldwin, L. A. (1999) Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis, *Toxicology Pathology* 27, 195-216.
34. Moya-Camarena, S. Y., Heuvel, J. P. V., Blanchard, S. G., Leesnitzer, L. A. and Belury, M. A. (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α , *J. Lipid Res.* 40, 1426-1433.
35. Belury, M. A., Moya-Camarena, S. Y.; Lu, M., Shi, L., Leesnitzer, L.M. and Blanchard, S. G. (2002) Conjugated linoleic acid is na activator and ligand for peroxissome proliferator-activated receptor-gama (PPAR γ), *Nutr. Res.* 22, 817-824.
36. Kang, K., Liu, W.; Albright, K. J., Park, Y. and Pariza, M. W. (2003) *Trans*-10, *cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 303, 795-799.
37. Granlund, L.; Juvenet, L. K.; Pedersen, J. I. Nebb, H. I. (2003) *Trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator, *J. Lipid Res.* 44, 1441-1452.
38. Girnum, G. D., Domann, F. E., Moore, S. A. and Robbins, M. E. C. (2002) Identification of a functional peroxissome proliferators-activated receptor response element in the rat catalase promoter, *Mol. Endocrinol.* 16, 2793-2801.
39. Mccall, M. and Frei, B. (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?, *Free Radical Bio. Med.* 26, 1034-1053.
40. Williams, K.J. and Fisher, E.A. (2005) Oxidation, lipoproteins and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory?, *Curr. Opin. Clin. Nutr.* 8, 139-146.
41. Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H. and Howard, B. V. (2004) Antioxidant Vitamin Supplements and Cardiovascular Disease, *Circulation* 110, 637-641.

*Artigo I: Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in
Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats*

42. Ha, Y. L., Grimm, N. K. and Pariza, M. W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid, *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.
43. Ha, Y. L., Storkson, J. and Pariza, M. (1990) Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated linoleic acid, *Cancer Res.* 50, 1097-1101.
44. Tsuzuki, T., Igarashi, M., Iwata, T., Ymauchi-Sato, Y., Yamamoto, T., Ogita, K., Suzuki, T. and Miyazawa, T. (2004) Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α -tocopherol, *Lipids* 39, 475-480.

**Conjugated Linoleic Acid, Lipid Accumulation and Hepatic Morphology Alteration in
Healthy Wistar Rats**

Short title: Conjugated Linoleic Acid and Hepatic Morphology

Lilia Ferreira Santos-Zago^{*}, Adriana Prais Botelho, and Admar Costa de Oliveira

Laboratory of Lipids, Department of Food and Nutrition, College of Food Engineering,

State University of Campinas, Campinas, SP, P.O. Box 6121, Postal Code 13083-862,

Brazil.

Abstract

CLA adverse effects, such as lipid accumulation and hepatic morphology change, are being studied because of their interference in lipid metabolism, which is also the reason for their beneficial effects. This work aims to evaluate the effects of the consumption of two commercial CLA mixtures on lipid content and liver morphology of rats. The investigation was done by biological assay with thirty rats divided into three groups: C, AE and CO. CLA concentration was 2% of feed consumption, and animals were supplemented for 42 days. Total lipid content of the liver was determined, and morphology of the organ was examined by Transmission Electronic Microscopy. Results of total liver lipid contents did not exhibit significant differences between the groups (C: 23.93 ± 3.64 %; AE: 22.19 ± 2.05 % and CO: 21.16 ± 0.90 %). Regarding hepatic histology, it was observed that

^{*} Corresponding author: Tel.: +551935214068; Fax: +551932514060.

E-mail address: lzago@fea.unicamp.br (L.F. Santos-Zago).

Abbreviations: CLA, conjugated linoleic acid; C, control group; AE, group with AdvantEdge[®] CLA; CO, group with One[®] CLA; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; TEM, transmission electronic microscopy; NASH, non-alcoholic steatohepatitis

although fat globules were visibly present in higher numbers and bigger size in CLA groups, organ morphology was normal, as both cytoplasm and organelles were undamaged. It was concluded that even though liver microscopic images indicated steatosis, from a statistical point of view supplementation for 42 days did not bring about lipid accumulation, nor did it alter hepatic morphology.

Key words: conjugated linoleic acid, liver morphology, liver lipids, non-alcoholic steatohepatitis.

Introduction

Conjugated linoleic acid (CLA) is the name given to a set of geometrical and position isomers of the octadecadienoic acid, with predominance (70-80 %) of the cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers [1,2]. CLA can be synthesised by ruminants by biohydrogenation of unsaturated fatty acids from the diet, or endogenously in the mammary glands. Since the late 1970s, when CLA was discovered, its consumption has been associated with physiological effects, among them body fat reduction, arteriosclerosis reduction, prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus, enhancement of bone mineralization, immune system modulation, antithrombogenic action, and antioxidant action [3,4,5]. However, there has also been significant investigation about the possibility of adverse effects of CLA consumption, particularly regarding increased susceptibility to biological lipid oxidation, resistance to insulin, and lipid accumulation in the liver; the latter can be one of the causes of non-alcoholic steatosis and steatohepatitis [6,7,8,9,10]. This hypothesis was raised because CLA can act as a ligand of by peroxisome proliferator activated receptors (PPAR) and inhibit their gene expression, particularly PPAR γ [11,12]. Studies show that inhibition of PPAR γ and also of PPAR α is related to the possibility of

development of non-alcoholic steatohepatitis. Furthermore, some authors report, based on biological assays with different experimental models, that CLA can lead to changes including not only lipid accumulation, but also significant lesions in liver cell organelles visible by transmission electron microscopy (TEM)[13,14]. Although CLA is naturally found in foods such as meat, milk and derivatives, the amounts are very small, and for that reason CLA is mainly consumed in the form of supplements. There are numerous commercial CLA mixtures in the market with different isomer proportions, but always with a predominance of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. The objective of this work was to assess the effect of commercial CLA mixture consumption on lipid content and morphology of the liver of healthy growing Wistar rats.

Materials and methods

Supplements: Supplements were linoleic acid Sigma (code L 1376), and the commercial conjugated linoleic acid mixtures AdvantEdge[®] CLA (EAS[™], Golden, CO, USA) and CLA One[®] Free Fatty Acid Oil 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients, Gurnee, IL, USA). The isomers composition of conjugated linoleic acid supplements was determined by gas chromatography [15] and it is expressed in Table 1.

Table 1. Isomers composition of conjugated linoleic acid mixtures (g/100g of fatty acids).

Isomers	Conjugated linoleic acid AdvantEdge® CLA (EAS™)	CLA One® Free Fatty Acid Oil 1 CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients)
	%	%
C18:2 cis-9. trans-11 CLA	40.12	36.81
C18:2 trans-10. cis-12 CLA	39.15	36.27
Total	79.27	73.08

Animals and diets: Biological essays used albino male healthy recently-weaned Wistar rats aged 21 to 23 days, with mean weight 59.7 ± 5.84 g, obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, State University of Campinas. During the assay the animals remained in stainless steel growth cages, and received water and food *ad libitum*. Temperature and humidity were kept in the range of 22 ± 1 °C and 60-70 % respectively, and the light/dark cycle was 12 hours. This work was approved by the Ethics Commission on Animal Experimentation (CEEA - IB/Unicamp), Protocol no. 564-1. Diet was AIN93G, prepared according to the American Society for Nutrition [16], with protein concentration of 12% (Table 2) [17].

Table 2. Composition of experimental diet [16].

Ingredients	g/kg
Cornstarch	430.796
Dextrinized cornstarch	143.060
Casein (81.5 % protein)	147.230
Sucrose	108.370
Soybean oil	70.000
Fiber	50.000
Mineral mix	35.000
Vitamin mix	10.000
L-cystine	3.000
Choline bitartrate	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.014

Experimental design: Thirty rats remained in a period of adjustment for 7 days, receiving water and the respective diets ad libitum. After this period the animals were randomly divided into 3 groups in order to achieve body weight homogeneity within and among groups. Group C (control) received linoleic acid; group AE received AdvantEdge[®] CLA, and group CO received CLA One[®]. Supplement concentration was 2 % of daily feed consumption. Animals were supplemented daily for 6 weeks. Body weight and feed consumption were determined every two days. At the end of the study part of the liver left lobe was extracted for histological examination and then they were removed, weighed,

frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before lyophilization for determination of total lipid content.

Supplementation: Animals were supplemented by orogastric intubation with disposable 1 mL syringes and gavage needles. The amount of supplement administered was computed every other day according to the average daily feed consumption of each group, i.e., supplementation followed the normal feed ingestion. The quantity in millilitres of each supplement was computed with help of the density, and ranged from 0.25 to 0.49 mL. Supplements were aspirated with the syringe and kept away from light till the moment of administration. Rats were removed group by group from the experiment room, placed in plastic boxes, and taken to the supplementation room. This procedure was done daily at 14h00 since rodent have nocturnal habits and were less satiated at this time.

Determination of total hepatic lipid contents: Determination of total hepatic lipid contents was done by the method of Bligh; Dyer [18] with some modifications due to sample peculiarities. About 1 g of lyophilized sample was homogenized in 5 mL of chloroform, 10 mL of methanol, and 4 mL of water, followed by continual rotary agitation for 30 minutes. After this, 5 mL of chloroform and 5 mL of 1.5% sodium sulphate aqueous solution were added, and the sample was vigorously and continually shaken for 2 minutes. After dilution and complete separation of phases, the upper methanol layer containing water and non-lipid compounds was aspirated, and the lower chloroform layer containing the lipids was filtered in quantitative paper filter to obtain a clear solution. From this volume, 2 mL were transferred in duplicate to a previously weighed Petri dish, which was placed in an oven at 100 °C for solvent evaporation. After cooling in a desiccator, the dishes were weighed, and total lipid percentage was computed.

Sample preparation for examination by transmission electronic microscopy: randomly

part of the liver left lobe of three rats each group (0.3 x 0.5 mm) was extracted and subjected to the protocols of fixation, post-fixation, dehydration, infiltration, inclusion and contrasting for transmission electronic microscopy (TEM) according to Yamasaki et al. [6], with some adaptations based on the protocols of Haddad et al.[19]. After extraction, samples were immediately fixated in a glutaraldehyde solution (2 %) in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.3) for 2 hours at 4 °C. After this, samples were washed in cacodylate buffer (3 times 10 minutes) and subjected to the post-fixation procedure, remaining in osmium tetroxide in cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.3) for another 2 hours at 4 °C. Before beginning ethanol series dehydration, samples leaving the post-fixation process were washed 3 times for 10 minutes in physiological solution with added sucrose (17.8 %), and then left in aqueous solution of uranyl acetate (0.5 %) with added sucrose (13.3 %) for 12 hours. For the dehydration process, samples were washed 3 times for 15 minutes in an ethanol series of 50 %, 70 %, 90 %, 95 % and 100 %, ending with two 15-minute washings in propylene oxide. Samples were then subjected to the procedures of infiltration and inclusion with propylene oxide and resin mixture in the proportions and sequence described in Table 3.

Table 3. Steps in the process of infiltration and inclusion of samples in propylene oxide and resin.

Steps	Proportion of propylene oxide and resin ¹		Time
	Propylene oxide	Resin	
1	2	1	1 hour*
2	1	1	1 hour *
3	1	2	1 hour *
4 (preliminary mould)	0	1	1 hour **
5 (permanent mould)	0	1	5 days***

¹ Epon 812 resin (resin:methyl nadic anhydride:dodecenyl anhydride succinic:2,4,6-tri(dimethylaminomethyl phenol) in the proportion of 5 : 2.5 : 3 : 0.25, polymerized at 60 °C for 72 hours.

* Temperature: ambient. ** Temperature: 37 °C. *** Temperature: 60 °C.

After inclusion in resin, samples were sent to the Electronic Microscopy Laboratory of the Biology Institute of the State University of Campinas for ultrathin cuts (70 nm thickness) which were placed in copper meshes (3 mm / 200 mesh). Samples were contrasted in uranyl acetate solution (5 %) in water for 20 minutes, and in lead citrate solution (2.66 g of lead nitrate dissolved in 60 mL of water, 3.52 g of sodium citrate and 32 mL of sodium hydroxide 1 N) for 5 minutes. After contrasting, samples were examined in a transmission electronic microscope (LEO 906 Zeiss).

Statistical analysis: Results were expressed as means $\pm$ SD. Data were analysed statically by ANOVA to test the effect of CLA mixtures. The effect of supplementation time on feed consumption and growth was also examined. The Tukey test was used to test the differences among groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$. The correlation between CLA intake and liver weight was obtained by Pearson Linear Correlation considering moderate coefficient, positive or negative, with **r** values between

0,5 e 0,95 and between - 0,5 e - 0,95, respectively. The software used for all tests was Statistical Analysis System [20].

Results and Discussion

Feed consumption, inicial and final body weight and feed efficiency, is showed in Table 4. Differences were found only between groups CE and AE ($P \leq 0.05$). Figure 1 represents the weight gain and feed consumption curve, of the rats during the period of CLA supplementation, and shows that growth was normal. Regarding feed consumption and weight gain of the rats during the supplementation period, it can be said that, even though differences between some of the groups were observed at certain moments, growth was normal. Feed consumption changes seen in the graph are a consequence of supplement amount correction. The administered concentration of CLA followed the feed consumption, i.e., as consumption rose, supplement quantity was raised, leading to a drop in feed consumption, because CLA, as a lipid, produced greater satiety in the rats. This occurred cyclically throughout the assay, but it is important to note that these oscillations did not compromise animal growth, as seen in the body weight curves.

*Artigo II: Conjugated Linoleic Acid, Lipid Accumulation and Hepatic Morphology
Alteration in Healthy Wistar Rats*

Table 4. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of feed consumption, initial and final body weight and feed efficiency of experimental and control groups over the six week intervention period.

Groups	Consumption (g)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Feed efficiency
C	631.2 $\pm$ 48.7 ^a	91.4 $\pm$ 2.3 ^a	284.0 $\pm$ 20.2 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^a
AE	645.7 $\pm$ 27.6 ^b	96.3 $\pm$ 5.5 ^a	299.8 $\pm$ 13.1 ^a	0.31 $\pm$ 0.01 ^a
CO	621.9 $\pm$ 30.9 ^a	96.7 $\pm$ 3.6 ^a	283.7 $\pm$ 9.6 ^a	0.30 $\pm$ 0.01 ^a

Values not sharing similar letter in the same column are different ($P \leq 0.05$) in the Tukey test.

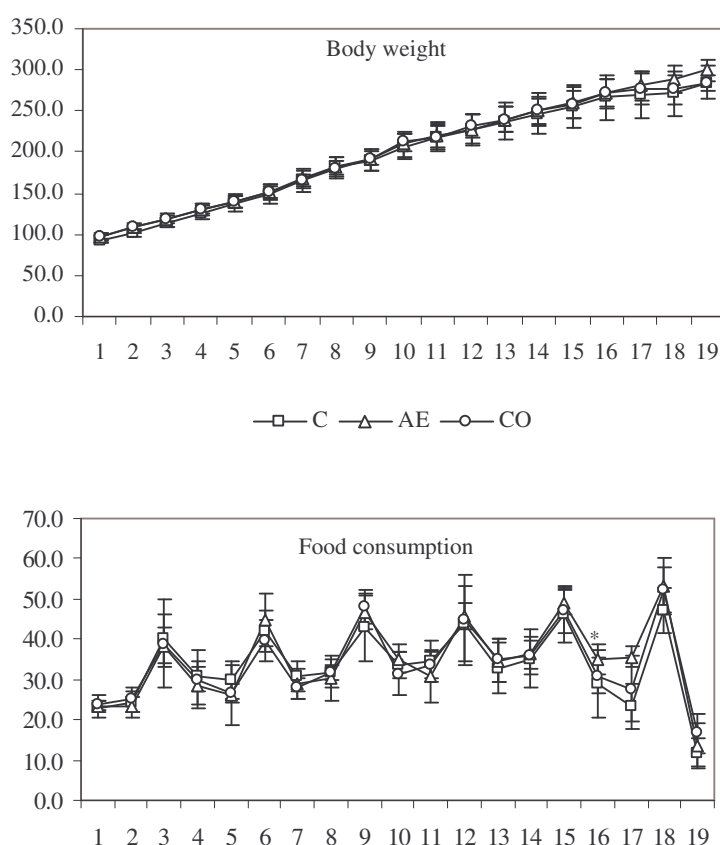


Figure 1. Body weight (g) and food consumption (g/rat/period) in control and experimental groups (n=10). Upper figure represent mean weight values (g); lower figure represent mean food consumption (g) in a period of two days. C: control group; AE: group supplemented with AdvantEdge® CLA; CO: group supplemented with One® CLA; * statistical difference between group AE and group C and CO according to Tukey test ($P \leq 0.05$).

Figure 2 shows a small positive linear correlation between CLA intake and liver weight, however, it were not significant ($r = 0.3587$, $p = 0.0618$). Results for rate of liver weight and body weight were expressed in Table 5 were can be observed that was no significant difference ($p > 0.05$) between control group and CLA supplemented groups. Regarding total hepatic lipids no significant difference ($p > 0.05$) was observed between the control group and groups receiving AdvantEdge[®] CLA or CLA One[®]. Mean total lipid content values of all groups was $22.42 \pm 1.40\%$ (Table 5). In a preliminary assay no differences were observed in total lipid content among groups, and the mean value was $19.10 \pm 0.85 \%$ after 21 days of supplementation. This result suggests that prolonged use of CLA could cause lipid accumulation in the liver, as the supplementation period in the present assay (42 days) was twice as long. Studies on the influence of CLA on total hepatic lipid content have reported that this fatty acid collects in the liver of experimental models, and this may result in steatosis and non-alcoholic steatohepatitis [13,14].

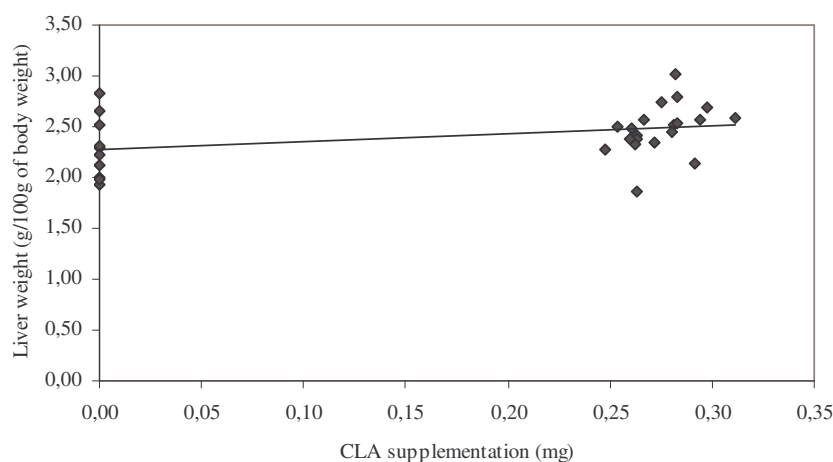


Figure 2. Correlation between CLA intake and liver weight. Although a linear positive correlation has been observed it was small and not significant ($P > 0.05$).

Table 5. Mean values $\pm$ standard deviation (n=10) of total liver lipid content, liver weight and liver weight:body weight rate of control and experimental groups.

Groups	Lipid content %	Liver Weight g	Liver weight: body weight rate
C	23.93 $\pm$ 3,64 ^a	2.5 $\pm$ 0.4 ^a	0.023 $\pm$ 0.03 ^a
AE	22.19 $\pm$ 2,05 ^a	2.8 $\pm$ 0.5 ^a	0.025 $\pm$ 0.03 ^a
CO	21.16 $\pm$ 0,90 ^a	2.6 $\pm$ 0.3 ^a	0.024 $\pm$ 0.02 ^a

Values with different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$) in the Tukey test
Values expressed on a dry basis; lyophilized sample.

C: control; AE: group that received AdvantEdge[®] CLA; CO: group that received CLA One[®].

Non-alcoholic steatohepatitis is the name of the disease when clinical and histopathological characteristics indicate steatohepatitis but alcohol consumption has been ruled out as the cause. The designation was introduced in the 1980s by Ludwig et al. [21], but currently the preferred name is non-alcoholic fatty liver disease, which includes steatosis and steatosis accompanied by hepatitis [22]. The etiopathogenesis of this kind of hepatic lipid disease is related to the presence of a number of pathologic condition such as obesity, diabetes, hyperlipidaemia, and oxidative stress. The latter has a double influence: direct, when oxidative stress itself causes liver damage; and indirect, when it activates an inflammatory response leading to liver damage [23,24,25,26].

Some researchers attempt to explain the appearance of steatosis and steatohepatitis by the determination of the expression of α and γ peroxisome proliferator activated receptors (PPAR α and PPAR γ). Rao; Reddy [27], in a review about peroxisome beta-oxidation and steatohepatitis, report that lipid accumulation in the liver occurs as a

result of inhibition of peroxisome enzymes such as acyl CoA oxidase, which is related to the oxidation of long and very long chain fatty acids, which are regulated by PPAR α . This information allowed the conclusion that PPAR α expression inhibition may result in steatohepatitis. The authors add that PPAR α induced fatty acid oxidation determines the severity of the hepatic phenotype with regard to lipid accumulation, depending on the energy stress to which the organism is subjected, since PPAR α inhibition can only lead to lipid accumulation in situations of prolonged fast. With regard to PPAR γ , Zhao et al. [28], in a work with Wistar rats, concluded that PPAR γ inhibition can lead to steatosis and steatohepatitis, since they found less PPAR γ expression in rats that exhibited higher degrees of lipid accumulation and inflammation. The authors suggest that supplementation with PPAR γ ligands can constitute an important tool in the treatment of hepatic lipid disease.

There is a hypothesis that CLA acts as a ligand of PPAR, especially PPAR α and PPAR γ [11,12,29]. If this is indeed the case, CLA supplementation may be efficient in hepatic lipid disease prevention, and may act as an adjuvant in its treatment. Many physiological properties of CLA are explained by the inhibition or activation of the expression of these transcription factors. One of the earliest studies demonstrating that CLA activates PPAR was by Moya-Camarena et al. [29]; its results showed that CLA increases PPAR α expression, especially the cis-9, trans-11 isomer. In 2002, Belury et al. [11] stated that supplementation with CLA isomer mixture in kidney cells of monkeys stimulated PPAR γ activation. Activation of PPAR α and γ may be related to the increase in long and very long chain fatty acid oxidation. This is one of the explanations, for instance, of the effects of CLA on lipid profile, since the increase in fatty acid oxidation caused by the

increased expression of PPAR α [30] could result in a reduction in blood concentration of lipids such as triacylglycerols.

In view of the above, CLA supplementation could be proposed as an adjuvant in the treatment of steatohepatitis, since CLA can act as a ligand of intracellular receptors. However, works that investigated the possibility of an inhibition of the expression of genes of these PPARs by CLA must also be taken into account. The study by Granlund et al. [31] sought evidence to explain the effect of CLA in body fat reduction, and found results that suggest PPAR γ expression inhibition, caused chiefly by the trans-10, cis-12 isomer. The authors discuss that these results could explain the mechanism by which CLA reduces body fat, since PPAR γ expressed exclusively in adipocytes is related to the differentiation process of these cells.

It is important to include hepatic histological monitoring in CLA experimental protocols as a tool to identify signs that the organ is compromised as a result of CLA supplementation, since there are indications that it might influence gene expression of nuclear transcription factors – PPAR α and PPAR γ , and thus lead to the development of steatohepatitis.

Regarding total hepatic lipid contents, in the present work no difference was found among groups ($p > 0.05$). However, there are studies reporting lipid accumulation in the liver as a consequence of CLA supplementation. In order to study the modulation of hepatic lipid composition by CLA, Belury; Kempa-Steczko [13] supplemented rats daily with different concentrations of CLA in the range of 0 to 1.5 % for 42 days. The authors found values of total hepatic lipid content significantly higher in groups receiving supplementation; the highest values were for rats receiving 1.5 % of CLA. In a later work, Yamasaki et al. [6] stated that in addition to increasing lipid autoxidation, CLA also brings

about hepatic morphology changes, as they observed, by transmission electronic microscopy, an accumulation of lipid, easily identified in the liver of rats supplemented with 2 % of CLA daily for 21 days, in comparison to the control group which did not receive this supplement. Considering the isomer-specific effects of CLA, it is important to discuss that CLA potential for lipid accumulation in the liver could be isomer dependent. The trans-10, cis-12 CLA seems to be the responsible for lipid accumulation in the rodent liver as a result of hyperinsulinemia, whereas cis-9, trans-11 did not have this effect [32].

In the present research, TEM images showed that although there was a larger number of fat globules in the liver of rats that received CLA, this increase was not sufficient to cause damage to the organ, since both cytoplasm and cell organelles remained undamaged. A similar conclusion was reached in the study mentioned above [6], which did not observe any change in number or morphology of cell organelles either. In contrast, Cherian et al. [14] supplemented white crest Leghorn chicken with different concentrations of CLA (0 / 0.5 / 1.0 / 2.0 %) for 42 days, and observed a significant hepatic lipid accumulation as well as abnormalities resulting from this, manifested by sinusoidal fibrin deposits and cell necrosis, especially in the group of birds that received the highest CLA concentration. Another study by the same author and with the same experimental model [33] also showed fat deposition, significant negative histological changes (dilated sinusoids, intrasinusoidal fibrin deposition, lymphocyte aggregates, and cell necrosis) in the liver of animals that consumed a diet with 1 % of CLA for 80 days. More recently, Macarulla et al. [34] investigated the effect of the trans-10, cis-12 and cis-9, trans-11 isomers on hepatic histology of hamsters and did not find abnormalities in the organs after the animals consumed a diet supplemented with 0.5% of CLA isomers for 6 weeks.

Figure 3 a, b, and c displays TEM liver images of animals that received supplementation of linoleic acid (group C), AdvantEdge[®] CLA (group AE), and CLA One[®] (group CO). These pictures show a large amount of mitochondria spread between the rough and smooth endoplasmic reticulum small and long in the central region of the cell, or large and round near the cell peripheral region -- which characterizes cell integrity [35].

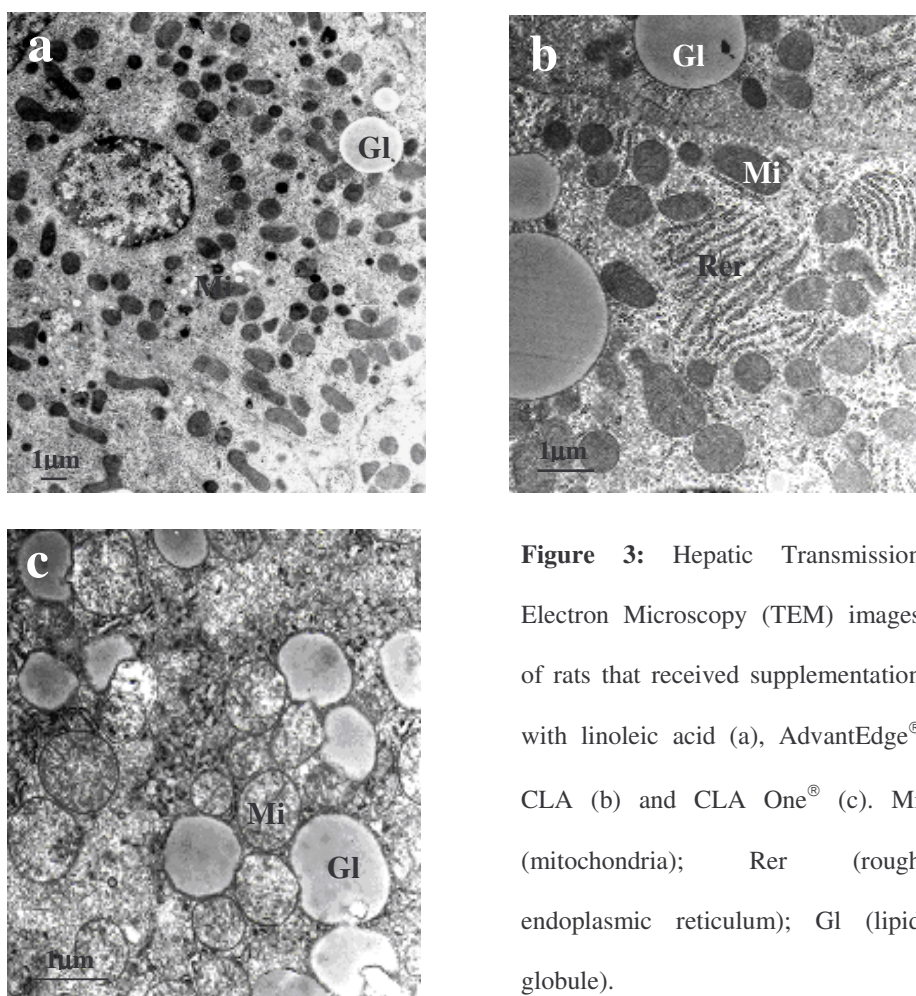


Figure 3: Hepatic Transmission Electron Microscopy (TEM) images of rats that received supplementation with linoleic acid (a), AdvantEdge[®] CLA (b) and CLA One[®] (c). Mi (mitochondria); Rer (rough endoplasmic reticulum); Gl (lipid globule).

The present research also had the goal of assessing the influence of vitamin E supplementation. This was based on the hypothesis that CLA favors oxidative stress [6,7,8,36], which in turn can be the trigger of a lipid hepatic disease of non-alcoholic origin. Membrane lipid oxidation can result in hepatocyte apoptosis, production of inflammatory cytokines, inflammation, and activation of stellate cells, all of which may lead to fibrogenesis [22]. In the present study no influence of vitamin E supplementation on the liver morphology of the animals was observed (non presented data). This result might be expected, since the CLA supplementation protocol did not trigger change in cell structures.

There is a hypothesis that vitamin E may prevent the appearance, or retard the development, of hepatic lipid disease. In a review work, Mehta et al. [37] discussed the possibility of using an antioxidant such as vitamin E in the treatment of hepatic lipid disease, since the increased oxidative stress is one of the causes of this disease. The authors cite a single study with humans which verified the effectiveness of vitamin E in the regression of the disease. That was the work by Lavine [38], who supplemented obese children with 400 mg of vitamin E per day, and assessed disease regression by monitoring the concentration of hepatic aminotransferases. It is relevant to point out here that monitoring hepatic histology is extremely important to assess the real regression of the disease and consequently the true action of the antioxidant, and this was not part of the experimental protocol of the study mentioned above. More recently, Elitsur et al. [39] reported the follow-up for one year of two children, one obese and the other not obese, diagnosed with NASH and subjected to vitamin E therapy (400 to 800 mg/day). In order to monitor the reversal of the steatohepatitis, the researchers determined hepatic aminotransferases and assessed liver histology. After 3 to 6 months of treatment, enzyme concentrations were back to normal, which apparently would lead to the conclusion that the disease regressed. However, in examining hepatic histology the authors observed that changes persisted, indicating that there had been no improvement in steatohepatitis. Such findings support the suggestion by the authors that histology is the gold standard to evaluate the therapeutic efficacy against hepatic lipid disease of non-alcoholic origin. In the same context, Akyüz et al. [40] also discuss the use of histology in order to assess the response of NASH to any therapy, after they found no correlation between aminotransferase concentration and histology. In view of the above, enzymology is a significant tool for the identification follow-up of non-alcoholic hepatic disease regression,

but hepatic histology monitoring is necessary in this process since it can lead to different responses especially concerning the efficacy of therapies used to reverse the condition.

Conclusions

After examining the results, it was concluded that groups supplemented with conjugated linoleic acid did not display a higher hepatic lipid content than the control group ($p > 0.05$). Although mean values did not indicate hepatic lipid accumulation, it was clearly observed that there was an increase of fat globules in the liver of rats that received CLA supplementation. However, this increase did not alter the morphology of cell organelles.

Acknowledgments: To Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Process 2003/07648-4); to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process 133874/2003-6) for financial support to the research and to researcher BOTELHO, A.P., respectively; and to Mrs Yara Fagnani Honório from Laboratory of Food Microscopy of the College of Food Engineering of the State University of Campinas for technical assistance.

References

1. Parodi PW. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J Dairy Sci* 1977;60:1550-1553.
2. Oustrowska E, Walker, GP, Doyle PT, Dunshea FR. Milk conjugated linoleic and trans-vaccenic acids are highest in Spring in grazing cows. *Asia Pac J Clin Nutr* 2004;13 Suppl:S53.

3. Salas-Salvadó J, Marquez-Sandoval F, Bulló M. Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effects on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci* 2006;46:479-488.
4. Pariza MW, Ashoor SH, Chu FS, Lund DB. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letter* 1979;7:63.
5. Pariza MW, Hargraves WA. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 1985;6:591.
6. 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 Agr Food Chem* 2000;48:6367-6371.
7. Basu S, Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Letters* 2000;468:33-36.
8. Risérus U, Vessby B, Ärnlov 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;80:279-283.
9. Choi JS, Song J. Conjugated linoleic acid, obesity, and insulin resistance: waiting for the day of liberation from chronic disease. *Nutrition* 2005;21:1170-1172
10. Brown JM, McIntosh MK. Conjugated linoleic acid in humans: Regulation of adiposity and insulin sensitivity. *J Nutr* 2003;133:3041-3046.
11. Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). *Nutr Res* 2002;22:817-824.

12. Kang K, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. *Trans*-10, *cis*-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression. *Biochem Bioph Res Co* 2003;303:795-799.
13. Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 1997;32:199-204.
14. Cherian G, Holsonbake TB, Goeger MP, Bildfell R. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 2002;37:751-757.
15. Sehat N, Kramer JK, Mossoba MM, Yurawecz MP, Roach JAG, Eulitz K, Morehouse KM, Ku Y. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences, *Lipids* 1998;33:963-971.
16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC.Jr. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939-1951.
17. Goena M, Mazo F, Fernández-González L, Tosar A, Fruhbeck G, Santidrián, S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Revista Española de Fisiología* 1989;45 Suplemento:55-60.
18. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
19. Haddad A, Sesso A, Attias M, Farina M, Meirelles MN, Silveira M, et al. Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. In: Souza W. editor. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. p.1-32.

20. SAS Institute Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary: USA inst., 2003.
21. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Ott BJ. Nonalcoholic steatohepatitis. Mayo Clinic experience with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc 1980;55:434-8.
22. Hoek BV. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. Scand J Gastroenterol 2004;39 Suppl 241:56-59.
23. Brunt EM. Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology. Semin Liver Dis 2001;21:3-16.
24. Chituri S, Farrel GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. Semin Liver Dis 2001;21:27-41.
25. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quiñones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. Clin Sci 2004;106:261-268.
26. Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. CMAJ 2005;172:899-905.
27. Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal β -oxidation and steatohepatitis. Semin Liver Dis 2001;21:43-55.
28. Zhao CY, Jiang LL, Li L, Deng ZJ, Liang BL, Li JM. Peroxisome proliferator activated receptor- γ in pathogenesis of experimental fatty liver disease. World J Gastroenterol 2004;10:1329-1332.
29. Moya-Camarena SY, Heuvel JPV, Blanchard SG, Leesnitzer LA, Belury MA. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . J Lipid Res 1999;40:1426-1433.

30. Akbiyik F, Cinar K, Demirpence E, Ozsullu T, Tunca R, Hazirolu R, et al. Ligand-induced expression of peroxisome proliferators activated receptor α and activation of fatty oxidation enzymes in fatty liver. *Eur J Clin Invest* 2004;34:429-435.
31. Granlund L, Juvenet LK, Pedersen JI, Nebb HI. *Trans*10, *cis*12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. *J Lipid Res* 2003;44:1441-1452.
32. Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. Dietary *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 2002;43:1400-1409.
33. Cherian G, Goeger MP. Hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens fed CLA or n-3 fatty acids. *Lipids* 2004;39:31-36.
34. Macarulla MT, Fernández-Quintela A, Zabala A, Navarro V, Echevarría E, Churrua I, et al. Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. *Nutrition* 2005;21:512-519.
35. Sato S. Ultrastructural and morphometric studies of normal rat hepatocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004; 32:131-140.
36. Santos-Zago LF, Botelho AP, Reis SMPM, Oliveira AC. Effect of conjugated linoleic acid on lipid autoxidation in Wistar rats. *Anais do 3 Simpósio em Ciência de Alimentos, Florianópolis, v. 3, 2005.*
37. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Morbarhan S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 2002;60:289-293.
38. Lavine JE. Vitamin E treatment of nonalcoholic steatohepatitis in children: A pilot study. *J Pediatr* 2000;136:734-738.

39. Elitsur Y, Lawrence Z, Wang R, Durst PR. Treatment for NASH:the value of histology. J Gastroenterol 2005;100:250-251.
40. Akyüz F, Demir K, Çvikbas U, Ökten A. What is the best indicator for evaluating treatment response in nonalcoholic fatty liver disease: histology or aminotransferase levels? J Gastroen Hepatol 2005;20:167-168.

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar¹

Conjugated Linoleic Acid Supplementation: Oxidative Stability of Supplements and Correlations with Total Hepatic Lipid Contents and Biological Lipid Oxidation Indicators in Wistar Rats

Título abreviado: CLA e estresse oxidativo

Short Title: CLA and oxidative stress

Lilia Ferreira Santos-Zago²

Adriana Prais Botelho³

Admar Costa de Oliveira⁴

Termos de indexação: ácido linoléico conjugado, autooxidação lipídica, estresse oxidativo, lípides hepáticos, morfologia hepática

Indexing terms: conjugated linoleic acid, lipid autoxidation, oxidative stress, liver lipids, liver morphology

¹ 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 Fapesp (Processo 2003/07648-4) e desenvolvido no Departamento de Alimentos e Nutrição/Faculdade de Engenharia de Alimentos/Universidade Estadual de Campinas.

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

Faculdade de Nutrição, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

³ Programa de Doutorado em Alimentos e Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

A atuação do CLA como antioxidante é um tanto quanto incerta visto sua estrutura química, que o caracteriza como um dieno conjugado, ou seja, um ácido graxo no estágio inicial de sua autooxidação. Devido a isso, pode-se especular que o mesmo possa atuar como pró-oxidante aumentando o estresse oxidativo em sistemas biológicos. O objetivo do trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa de misturas comerciais de CLA e buscar possível correlação entre a suplementação com CLA e o conteúdo total de lípides hepáticos, e também alguns indicadores da oxidação lipídica em ratos. Um ensaio biológico com trinta ratos divididos em três grupos (n=10) caracterizando os grupos C (controle), AE (AdvantEdge® CLA) e CO (CLA One®) foi realizado. A concentração administrada foi de 2 % em relação ao consumo de dieta e os animais foram suplementados durante 42 dias. O conteúdo total de lípides do fígado foi determinado e a morfologia do órgão foi examinada por meio de microscopia ótica. Índice de peróxido (IP) e malondialdeído (MDA) foram determinados para avaliar a estabilidade oxidativa dos suplementos *in vitro*. IP, MDA, 8-iso-PGF_{2α} isoprostana e catalase foram determinados como indicadores da oxidação dos lípides biológicos. Os resultados demonstraram baixa estabilidade do CLA à oxidação *in vitro*. As associações entre o consumo de CLA e MDA ($r = -0,7914$, $p < 0,0001$) e catalase ($r = -0,5991$, $p = 0,008$) foram moderadas, negativas e altamente significativas demonstrando que o CLA reduziu a oxidação lipídica *in vivo*. O conteúdo dos lípides totais hepáticos não aumentou e a morfologia do órgão permaneceu íntegra. Por outro lado, embora esse protocolo de suplementação com CLA tenha reduzido a oxidação lipídica, há que se considerar a tendência para o aumento de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana e peróxidos induzido

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

pelo CLA como perspectiva de continuidade das pesquisas sobre a reinvestigação do efeito antioxidante do CLA.

Abstract

The claimed action of CLA as an antioxidant is unexpected and unclear, in view of its chemical structure -- it is a conjugated diene, i.e., a fatty acid in its initial stage of autoxidation. Indeed, it can be speculated that it could act as a pro-oxidant, increasing oxidative stress in biological systems, nevertheless it has carbon-carbon bonds in the *trans* configuration. The objective of the present work was to evaluate the oxidative stability of commercial CLA mixtures, and to investigate a possible correlation between CLA supplementation and total hepatic lipid content, as well as some lipid oxidation indicators in rats. A biological assay was done with thirty rats divided into three groups (n=10) characterized as C (control), AE (AdvantEdge® CLA) and CO (CLA One®). The mixtures were administered in the concentration of 2% of the total diet consumption, and animals were supplemented for 42 days. The total liver lipid content was determined, and the morphology of the organ was examined by optical microscopy. Peroxide (IP) and malondialdehyde (MDA) indexes were determined in vitro in order to evaluate the oxidative stability of the supplements. IP, MDA, 8-iso-PGF2 α isoprostane and catalase were determined as biological lipid oxidation indicators. Results indicated a low in vitro oxidation stability of CLA. Associations between CLA consumption and MDA ($r = -0.7914$, $p < 0.0001$), and catalase ($r = -0.5991$, $p = 0.008$) were moderate, negative and highly significant, demonstrating that CLA reduced in vivo lipid oxidation. Total hepatic lipid content did not increase, and the organ remained morphologically undamaged.

However, even though this CLA supplementation protocol did reduce lipid oxidation, a tendency was observed to an increase of 8-iso-PGF₂ alpha isoprostane and peroxides induced by CLA. Further research may be needed to verify its antioxidant effect.

Introdução

O efeito do CLA sobre o processo de autooxidação lipídica tem sido bastante pesquisado nos últimos anos, e os resultados são um tanto quanto ambíguos, os quais não permitem ainda conclusões claras a respeito da sua atuação como agente antioxidante. A presença de duplas ligações na configuração *trans* em isômeros do CLA contribui para a estabilidade do mesmo à oxidação, no entanto, 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 em sistemas biológicos; o fato é que, embora exista controvérsias, o CLA parece apresentar uma autoproteção à oxidação. Mas, o ato de consumir um ácido graxo em seu estágio inicial de autooxidação estimulou o aparecimento de estudos objetivando reinvestigar o efeito antioxidante atribuído ao CLA. Pouco tempo depois da identificação do CLA muitos grupos de pesquisadores já apontavam indícios do possível efeito pró-oxidante do CLA 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-dihidroPGF₂ e 8-iso-PGF_{2α} isoprostana, respectivamente e da atividade biológica dos sistemas enzimáticos de proteção a oxidação, assim como, de reparo aos danos causados por tal processo como, a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a superóxido

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

dismutase (SOD) ^{1,2,3,4,5}. A partir do ano 2000 muitos trabalhos, particularmente em humanos, demonstram claramente que o CLA induz a peroxidação lipídica, visto que indicadores bastante específicos da oxidação dos lípides biológicos estão significativamente aumentados após suplementação com CLA ^{6,7,8,9,10}. Por outro lado, estudos comprovando a ação antioxidante do CLA são freqüentes ^{11,12}, o que aumenta ainda mais a dificuldade de se estabelecer um consenso a respeito da ação do CLA sobre o processo de oxidação lipídica.

Muitas são as variáveis a serem controladas e os estudos apresentam protocolos muitos distintos uns dos outros quanto ao modelo experimental, tipo, dose, tempo de suplementação e indicadores do estresse oxidativo e seus respectivos métodos e local de determinação. Outro efeito deletério do CLA que tem sido reportado é o de levar ao acúmulo de lípides no fígado de modelos experimentais como roedores e aves podendo levar ao aparecimento de esteatose e esteatohepatite, cuja etiologia está relacionada com uma série de situações patológica, dentre elas, o aumento do estresse oxidativo ^{13,5,14}. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estabilidade oxidativa de duas misturas comerciais de CLA e buscar o grau de associação entre o consumo dessas misturas por ratos Wistar saudáveis em crescimento e o conteúdo total de seus lípides hepáticos e também alguns indicadores da oxidação lipídica.

Materiais e Métodos

Suplementos: os suplementos utilizados foram ácido linoléico 60 % Sigma (código L 1376), as misturas comerciais de ácido linoléico conjugado 75 % AdvantEdge® CLA

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

(EASTM, Golden/CO, USA) e 75 % CLA One® Free Fatty Acid Oil 1CLA1-FFBL-KG (Pharmanutrients, Gurnee/IL, USA).

Estabilidade oxidativa dos suplementos: foi determinada dentro de um período de 90 minutos, tempo que os suplementos ficavam armazenados a 25°C e na ausência de luz até que todos os animais fossem suplementados. Para a avaliação da estabilidade oxidativa dos suplementos foi determinado o índice de peróxido utilizando o método oficial da AOAC ¹⁵ e malondialdeído de acordo com método proposto por Sinnhuber; Yu ¹⁶.

Animais e dietas: para a realização dos ensaios biológicos foram utilizados ratos Wistar, albinos, machos, saudáveis, recém-desmamados com idade entre 21 e 23 dias, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Os animais permaneceram em gaiolas individuais de crescimento e receberam água e alimentação sob o sistema de livre acesso, sendo a temperatura e a umidade do ar controladas na faixa de 22 ± 1 °C e 60-70 % respectivamente e ciclo de claro/escuro de 12 horas. A dieta utilizada foi a AIN93G elaborada conforme o *American Institute of Nutrition* ¹⁷ com concentração de proteína bruta de 12 % ¹⁸. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – IB/UNICAMP) – Protocolo nº 564-1.

Desenho experimental: o protocolo experimental do ensaio biológico foi feito da seguinte forma: trinta ratos permaneceram em período de adaptação por 7 dias recebendo as respectivas dietas e água potável sob o sistema de livre acesso. Após este período os animais foram divididos em 3 grupos de forma aleatória objetivando a homogeneidade quanto ao peso corporal tanto intra quanto intergrupo. Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira: grupo C (controle) que recebeu ácido linoléico 60%, grupo AE que recebeu AdvantEdge® CLA e grupo CO que recebeu CLA One® Free Fatty Acid

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar

Oil. A concentração de suplemento utilizada foi de 2 % em relação ao consumo diário de dieta. Os animais foram suplementados diariamente durante 6 semanas. Foram feitas as determinações de índice de peróxido hepático (produtos primários da autooxidação lipídica), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS séricas e hepáticas (produtos secundários da autooxidação lipídica), 8-iso-PGF₂ α isoprostana e atividade da catalase. O peso do fígado foi obtido e o conteúdo de lípidos totais do órgão foi determinado.

Suplementação: os animais foram suplementados por meio de entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis de 1 mL e agulhas de gavagem. A quantidade de suplemento administrada era calculada a cada dois dias com base no consumo médio diário de dieta de cada grupo, sendo assim a suplementação acompanhou a ingestão de dieta normal dos ratos. Levou-se em consideração a densidade de cada suplemento para o cálculo da quantidade em mililitros, que variou de 0,25 a 0,49 mL. Os suplementos eram aspirados pela seringa e mantidos ao abrigo da luz até o momento da administração. Os ratos eram retirados grupo a grupo da sala de experimentação, acondicionados em caixas plásticas e levados à sala em que eram suplementados. Este procedimento ocorria diariamente durante o dia e sempre no mesmo horário, visto que os roedores possuem hábitos noturnos.

Determinação do índice de peróxido (produtos primários da autooxidação lipídica): para a determinação do índice de peróxidos foi necessária a extração prévia dos lípidos do fígado de cada rato, a qual foi feita utilizando o método de Bligh; Dyer ¹⁹ com algumas modificações em decorrência de particularidades da amostra. Imediatamente após a extração dos lípidos realizou-se a determinação do índice de peróxido utilizando o método oficial da AOAC ¹⁵, o qual é baseado na oxidação do iodo na presença de iodeto de potássio pelo peróxido presentes na amostra, assumindo-se que todas as substâncias oxidantes

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar

presentes na amostra são peróxidos. Para o cálculo do índice de peróxidos foi considerada a quantidade de lipídios presente na solução clorofórmica resultante do procedimento de extração dos lipídios segundo Bligh; Dyer ¹⁹.

Determinação de malondialdeído (produto secundário da autooxidação lipídica) – valor

TBA: a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi feita no soro e no fígado de cada animal. O método utilizado para esta análise foi o proposto por Sinnhuber; Yu ¹⁶, que tem como princípio básico a formação de um pigmento vermelho-róseo composto por 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico e 1 de malonaldeído. Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído/kg de amostra.

Determinação de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana: a determinação de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana, no plasma dos ratos, foi feita por imunoensaio enzimático utilizando kit comercial Cayman Chemical catálogo número 516351. O método baseia-se na competição entre a 8-iso-PGF_{2α} isoprostana e a 8-iso-PGF_{2α} isoprostana-acetilcolinesterase conjugada (marcador) por um limitado número de sítios ligadores para antisoro específico de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana. Os resultados foram expressos em pg/mL de amostra.

Determinação da atividade da catalase: para a determinação da atividade da catalase foi utilizada a metodologia descrita por Góth ²⁰ que consiste na determinação da atividade da catalase sérica por meio da reação com o peróxido de hidrogênio. Os resultados foram expressos em kU/L, considerando que uma unidade de catalase decompõe, nas condições acima descritas, 1 μmol de peróxido de hidrogênio por minuto.

Análise da histologia hepática: parte do lobo esquerdo do fígado (0,3 x 0,5 mm) de 4 ratos de cada grupo (controle e experimental) foi extraído e imediatamente fixado em solução de glutaraldeído (2%) em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,3) durante 15 horas a

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

4°C. Após esta etapa, as amostras seguiram para o processo de desidratação. Para o processo de desidratação as amostras foram lavadas 3 vezes por 15 minutos em série etanólica iniciando com etanol 50 %, seguido de 70 %, 90 %, 95 % e 100 %, finalizando com duas lavagens de 10 minutos em xilol, quando as amostras foram submetidas ao processo de inclusão em parafina. Depois de incluídas em parafina as amostras foram cortadas (3 µm de espessura) e submetidas, após desparafinização e hidratação, a coloração com Hematoxilina e Eosina ²¹.

Análise Estatística: a associação entre o consumo de CLA e os indicadores da oxidação lipídica foi obtida pela análise de correlação linear de Pearson, considerando coeficientes moderados de correlação, positivos ou negativos, com valor de r entre 0,5 e 0,95 e entre - 0,5 e - 0,95, respectivamente. O *software* utilizado para a análise foi o *Statistical Analysis System* ²².

Resultados e Discussão

Quanto à estabilidade oxidativa das misturas comerciais de CLA pode-se dizer que essa foi diferente entre as mesmas. As curvas que representam a produção de peróxidos e malondialdeído entre os tempos T₀ e T₉₀ podem ser observadas na Figura 1. Quanto aos valores de IP, esses foram maiores em AE (T₀ = 21,87 ± 3,57 mEq / kg e T₉₀ = 37,05 ± 1,17 mEq / kg) quando comparados com CO (T₀ = 2,35 ± 0,19 mEq / kg e T₉₀ = 2,44 ± 0,29 mEq / kg) e C (T₀ = 2,03 ± 0,13 mEq / kg e T₉₀ = 2,83 ± 0,73 mEq / kg). Já os valores de malondialdeído foram maiores para C (T₀ = 41,08 ± 4,80 mg MDA / kg e T₉₀ = 46,16 ± 2,22 mg MDA / kg) em relação ao AE (T₀ = 4,61 ± 0,04 mg MDA / kg e T₉₀ = 9,67 ± 0,14 mg MDA / kg) e CO (T₀ = 5,27 ± 0,47 mg MDA / kg e T₉₀ = 13,75 ± 2,47 mg MDA / kg).

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

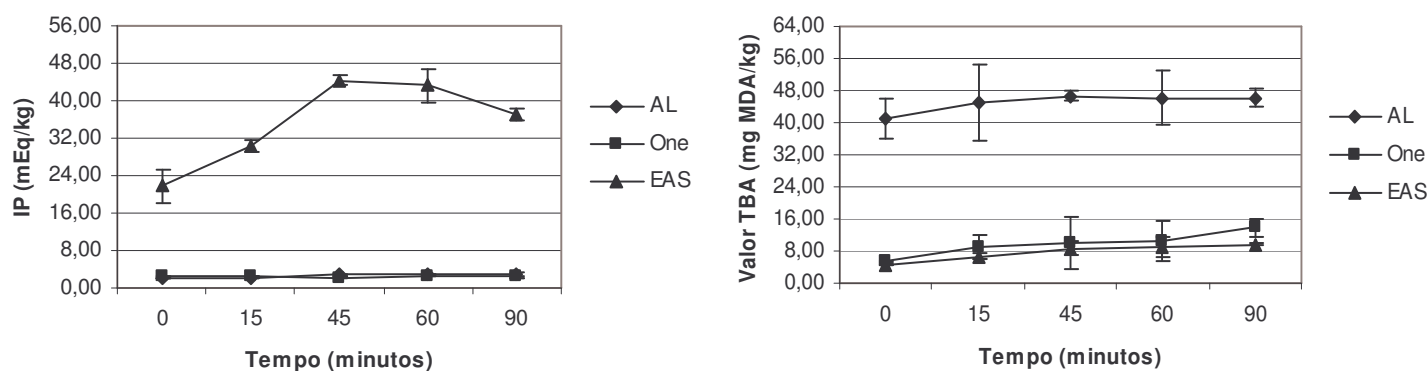
Embora as pesquisas quanto à estabilidade oxidativa dos isômeros de CLA sejam um tanto quanto divergentes, é comum o fato de que o CLA seja mais estável que outros ácidos graxos poliinsaturados que não tenham ligações do tipo *trans*; até mesmo dentre os isômeros de CLA, aqueles que possuem ligações do tipo *cis* são menos estáveis à oxidação em relação aos *trans*. A estabilidade oxidativa do CLA também é dependente da esterificação para formar acilgliceróis, especialmente os triacilgliceróis, de forma que a estabilidade é menor quando o CLA está em sua forma livre^{23,24,25}. Na presente pesquisa, embora ambas misturas possuam seus isômeros em sua forma livre a mistura CO foi estável à autooxidação em comparação ao ácido linoléico. É importante ressaltar que tanto as misturas de CLA quanto o ácido linoléico foram armazenados da mesma forma e pelo mesmo tempo; pode-se especular que a diferença de estabilidade entre as misturas tem relação com a fonte e procedimento tecnológico que originaram os isômeros de CLA.

O início das pesquisas com CLA foi marcado pela descoberta de seu efeito anticarcinogênico, explicado pela sua ação antioxidante, especialmente do isômero *cis*-9, *trans*-11. A ação antioxidante do CLA era explicada pela formação de β -hidroxiacroleína de CLA, que por sua vez seria a responsável por inibir reações do tipo Fenton já que formariam quelatos com o ferro²⁶. Mas, ainda na década de 90, começaram a aparecer os estudos de reinvestigação das propriedades antioxidantes do CLA baseados na hipótese de que esse ácido graxo conjugado, ou seja, um ácido graxo em seu estágio inicial de autooxidação atuaria como agente pró-oxidante. Um importante estudo foi o de Van Den Berg; Cook; Tribble¹; os autores demonstraram que o CLA não atua como antioxidante, mesmo em condições de estresse oxidativo mediadas por íons metálicos. As pesquisas apontando o CLA como pró-oxidante em sistemas biológicos aconteceram de forma mais

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

acentuada a partir de 2000, quando muitos pesquisadores começaram a afirmar categoricamente que o CLA aumenta o estresse oxidativo, particularmente em humanos. Por meio da determinação de inúmeros indicadores da oxidação dos lípides biológicos muitos estudos trazem dados que confirmam a atuação do CLA como pró-oxidante ^{5,6,7,8,9,10}. No entanto, para intrigar ainda mais a comunidade científica a respeito da influência do CLA sobre o processo de oxidação dos lípides biológicos, estudos recentes demonstram a ação antioxidante do CLA, como por exemplos os estudos de Kim et al. ¹¹ com ratos Sprague-Dawley e de Arab et al. ¹² com fibroblastos humanos.

Figura 1: Curva da produção de Peróxidos (IP) e Malondialdeído (Valor TBA) das misturas comerciais de CLA (One e EAS) e do ácido linoléico entre os tempos inicial (T_0) e final (T_{90}) da entubação orogástrica.



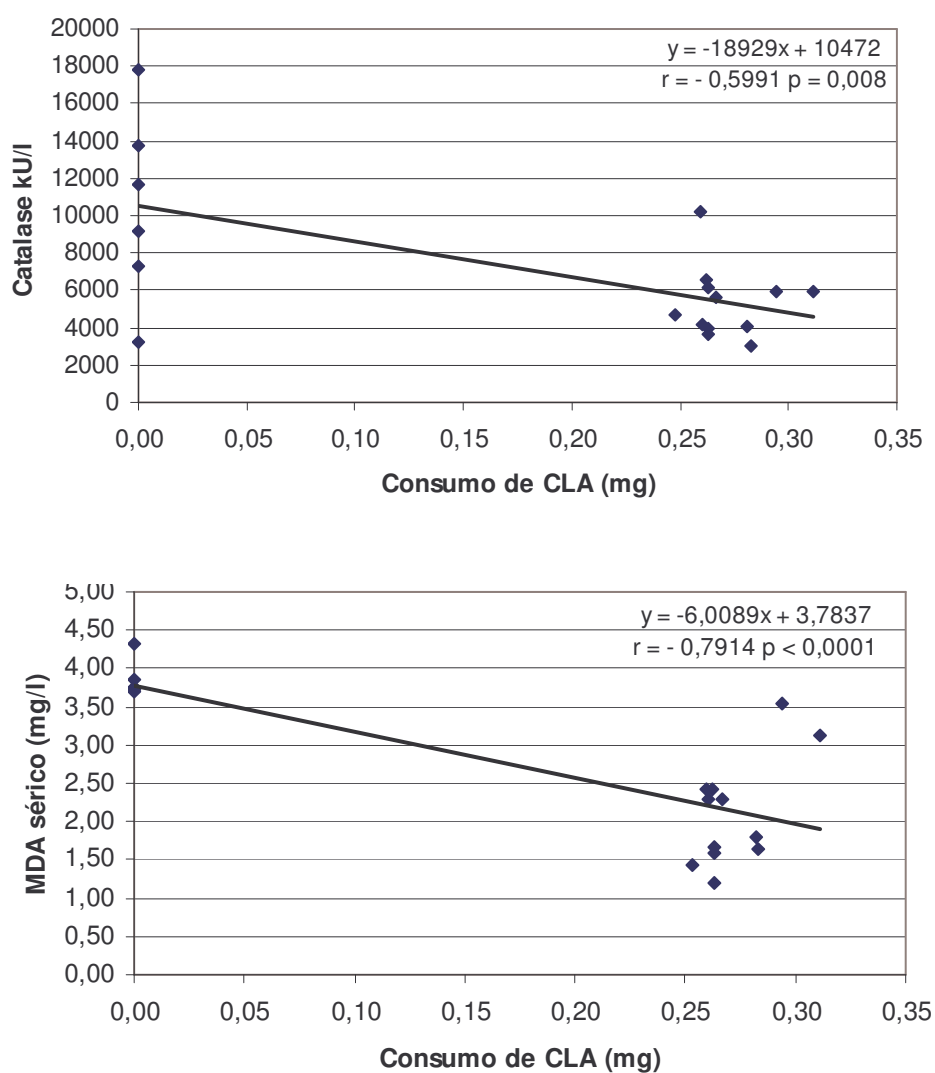
Quanto às correlações obtidas entre o consumo das misturas comerciais de CLA pelos ratos e os indicadores da oxidação dos seus lípides biológicos, pode-se dizer que esse ácido graxo conjugado poderia atuar como um agente antioxidante. Pode-se chegar a essa conclusão quando se analisa os resultados referentes à concentração sérica de malondialdeído e atividade sérica da catalase, visto que foram encontrados coeficientes de

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

correlação moderados, negativos e significativos entre essas variáveis e o consumo de CLA (Figura 2). Esses resultados são diferentes dos resultados obtidos por alguns pesquisadores que objetivam reinvestigar as propriedades antioxidantes do CLA, os quais observam valores de MDA mais altos quando comparados com seus respectivos grupos controles^{4,6,7,27}. Utilizou-se também como indicador da oxidação dos lípides biológicos pela via não enzimática, um eicosanóide da série F denominado 8-iso-PGF_{2α} isoprostana, que é considerado indicador bastante específico para avaliar o grau de estresse oxidativo em diversos modelos experimentais²⁸. As correlações obtidas entre a concentração plasmática desse eicosanóide e o consumo das misturas comerciais de CLA foram positivas, no entanto, essas foram baixas e não significativas ($r = 0,3033$, $p = 0,2003$).

Esse indicador tem sido muito utilizado nos trabalhos (muitos em humanos) objetivando avaliar a ação do CLA sobre a oxidação dos lípides biológicos e, na maioria dos estudos, o que se observa é o aumento da concentração do mesmo^{6,7,8,9,10}. O mesmo resultado foi observado quando realizada a correlação entre a concentração de peróxidos hepáticos e consumo de CLA ($r = 0,3747$, $p = 0,1458$). Ressalta-se que embora as correlação entre consumo de CLA e concentração plasmática de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana e hepática de peróxidos não tenha sido significativa, existe uma tendência para o aumento desses indicadores após o consumo de CLA, tendência esta que associada a gama de informações à respeito da possível ação pró-oxidante do CLA reportada pela comunidade científica, deve ser considerada como respaldo para dar continuidade as pesquisa de reinvestigação das propriedades antioxidantes do CLA.

Figura 2. Correlação entre o consumo das misturas comerciais de CLA pelos ratos e a concentração sérica de malondialdeído (MDA) e atividade sérica da catalase.



Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

Além da possibilidade de aumentar a susceptibilidade dos lípides biológicos à oxidação, o CLA também tem sido apontado por alguns pesquisadores como responsável por promover acúmulo de lípides no fígado de animais o que pode resultar em esteatose e esteatohepatite ^{13,5,15}. No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) quanto ao conteúdo de lípides total hepático, entre o grupo controle e os grupos que receberam AdvantEdge[®] CLA ou CLA One[®]. O valor médio do conteúdo lipídico total dos grupos era de $22,42 \pm 1,40$ %. Em ensaio preliminar ao presente não foram observadas diferenças quanto ao conteúdo total de lípides hepáticos entre os grupos, cujo valor médio foi de $19,10 \pm 0,85$ %. O presente resultado sugere que o uso prolongado de CLA poderia promover acúmulo de lípides no fígado, visto que o tempo de suplementação do presente ensaio foi o dobro (42 dias). A associação entre o consumo das misturas de CLA e o conteúdo de lípides total do fígado dos animais demonstrou coeficientes negativos e baixos, porém significativos (Figura 3). No entanto, ao observar as imagens obtidas por meio de microscopia óptica, observou-se que o número de glóbulos de gordura no fígado dos ratos que foram submetidos à suplementação com CLA, especialmente o grupo AE, é maior em número e tamanho (Figura 4). Apesar dessa observação, verificou-se que não houve alteração na histologia hepática dos animais; o fato de observar mais glóbulos de lípidios nos fígados dos ratos que consumiram CLA caracteriza uma informação de natureza qualitativa, no entanto não menos importante, já que permite conclusões sobre a integridade das células hepáticas. Anormalidades na morfologia hepática acompanhadas do acúmulo de lípidos em animais suplementados com CLA têm sido reportadas por alguns pesquisadores ^{14,29}, enquanto outros observam ou não o acúmulo de lípidos sem alterar a morfologia do

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar

órgão ^{5,30}. Nas condições de suplementação do presente trabalho não se observou acúmulo de lípidos hepáticos e tampouco alteração da morfologia do órgão dos ratos.

Figura 3. Correlação entre o consumo das misturas comerciais de CLA pelos ratos e a concentração de seus lípidos totais hepáticos.

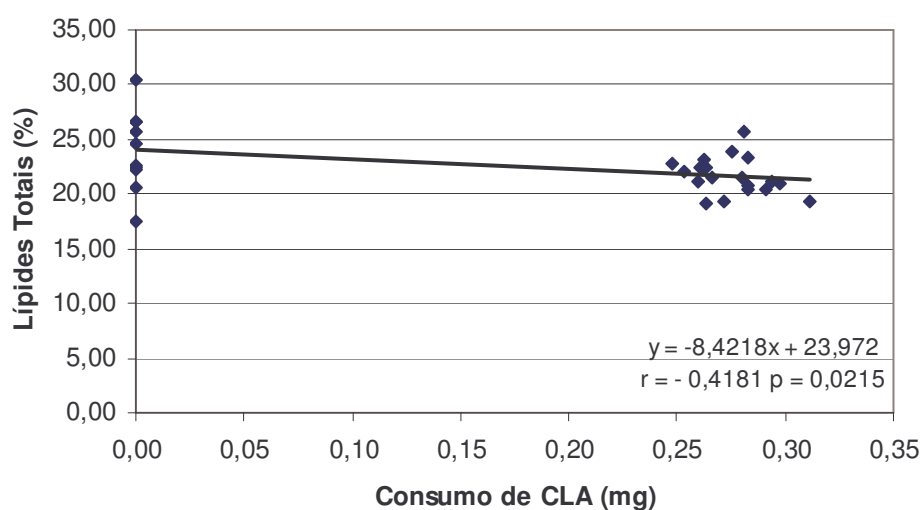
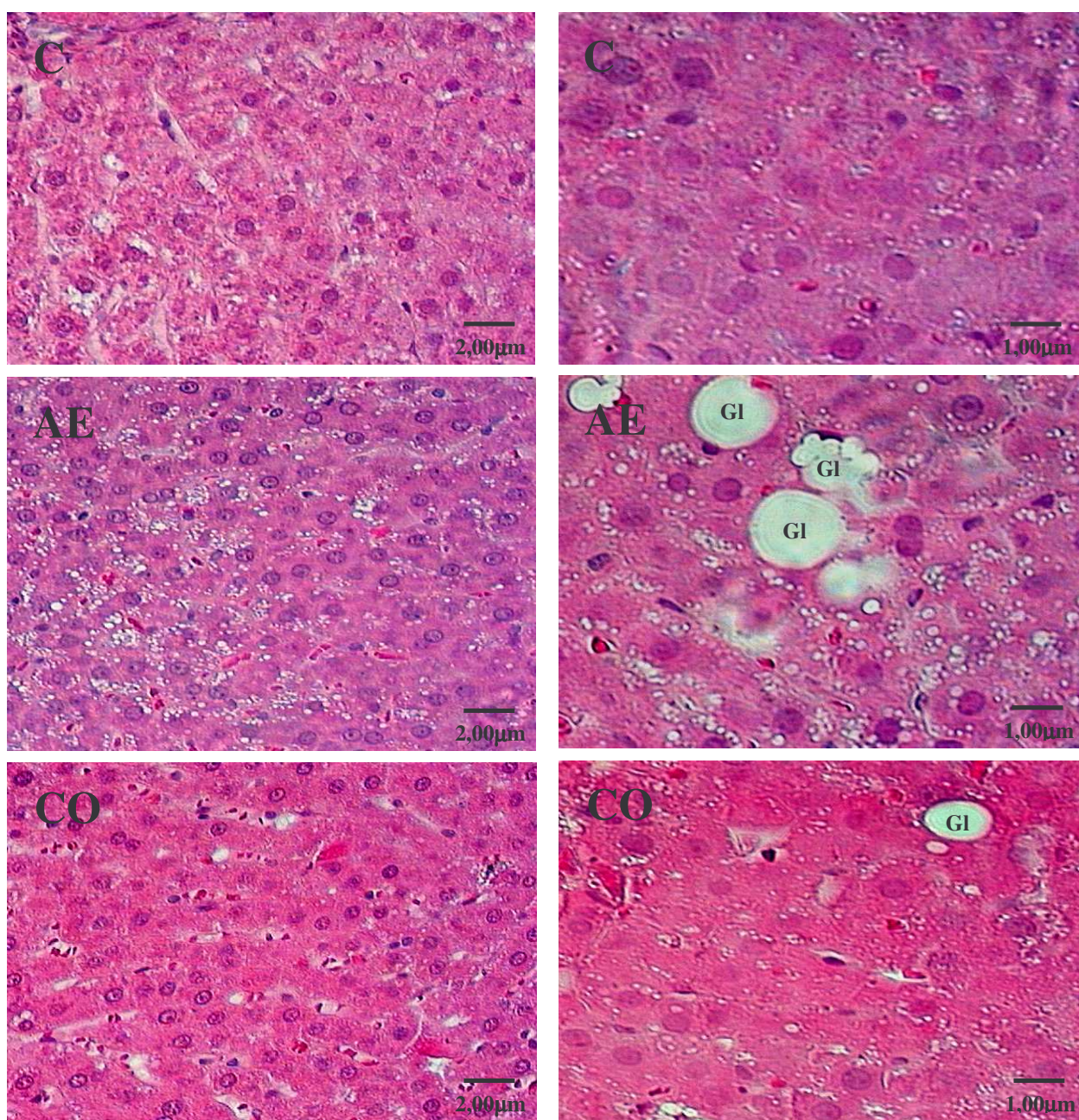


Figura 4. Imagens hepáticas obtidas por microscopia óptica de animal que recebeu suplementação com ácido linoléico (C) e com as misturas comerciais de CLA AdvantEdge® CLA (AE) e CLA One® (CO). Gl. Glóbulo de gordura.



No que diz respeito aos mecanismos de ação pelos quais o CLA influencia o processo de oxidação lipídica, esses não foram identificados na presente pesquisa, mas de acordo com as pesquisas mais recentes em CLA há fortes indícios que a ação desse ácido graxo sobre receptores nucleares denominados receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) seria a explicação não somente para o efeito anti/pró-oxidante, mas para todos os efeitos do CLA até hoje identificados. Um dos primeiros trabalhos que demonstrou o controle da expressão gênica pelo CLA por meio da ação desse sobre PPAR data do final da década de 90 ³¹. A partir de então muitos trabalhos apontam o CLA como modulador da expressão de PPAR ou então como modulador da expressão de genes que estão sob o controle transcricional de PPAR de forma a explicar os seus efeitos fisiológicos ^{32,33,34,35,36,37}. Embora já seja de conhecimento da comunidade científica a ação do CLA sobre os PPARs, ainda há muito o que se estudar a respeito da modulação da expressão gênica induzida por esse ácido graxo de forma a explicar suas ações benéficas e até mesmo seus efeitos adversos. Acredita-se que a biologia molecular moderna contribua de forma significativa na obtenção dessas explicações no sentido de estabelecer um consenso a respeito da utilização do CLA como um coadjuvante na prevenção e tratamento de diversas doenças metabólicas.

Conclusão

Quanto à estabilidade à autooxidação das misturas comerciais de CLA pode-se concluir que a mesma foi diferente tendo a mistura CO se apresentado bastante estável em comparação ao ácido linoléico. Quanto a influência das misturas de CLA sobre a oxidação

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

dos lípides biológicos, pode-se dizer que essa foi reduzida, visto os coeficientes das correlações entre a suplementação e a concentração sérica de malondialdeído e atividade sérica da catalase. Por outro lado, há que se considerar, como perspectiva de continuidade da Pesquisa, a tendência para o aumento de 8-iso-PGF_{2α} isoprostana plasmática e peróxidos hepáticos, cujo aumento induzido pelo CLA é bastante reportado na literatura. Quanto ao conteúdo dos lípides hepáticos, esse não aumentou após o consumo de CLA. Embora tenha-se observado por meio de microscopia óptica um aumento qualitativo dos glóbulos de lipídios em comparação ao controle, não houve alteração da morfologia do órgão. Por fim, as perspectivas de continuidade da presente Pesquisa a partir de agora são de aprofundamento das investigações sobre a ação do CLA 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 controle da obesidade e doenças associadas.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2003/07648-4); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 133874/2003-6) pelo apoio financeiro à Pesquisa e à pesquisadora BOTELHO, A.P., respectivamente; e a Sr. Yara Fagnani Honório do Laboratório de Microscopia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos e a Dra Elisângela Faria do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas pela assistência técnica.

Referências

1. Van Den Berg JJM, Cook NE, Tribble DL. Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid. *Lipids*. 1995; 30:599-605.
2. Cantwell H, Devery R, Stanton C, Lawless F. The effect of a conjugated linoleic acid on superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in oxidatively-challenged liver cells. *Biochem Soc T*. 1998; 26:62.
3. Banni S, Angioni E, Contini MS, Carta G, Casu V, Iengo GA, Melis MP, Deiana M, Dessi MA, Corongiu FP. Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J Am Oil Chem Soc*. 1998; 75:261-67.
4. 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; 34:833-39.
5. Yamasaki M, Mansho K, Mishima H, Kimura G, Sasaki M, Kasai M, Tachibana H, Yamada K. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J Agr Food Chem*. 2000; 48:6367-71.
6. Basu S, Risérus U, Turpein A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. *Clin Sci*. 2000; 99(6):511-16.
7. Basu S, Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Letters*. 2000; 468:33-36.
8. Risérus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Ärnlov J, Vessby B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein. *Circulation*. 2002; 106:1925-29.

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

9. Risérus U, Vessby B, Ärnlov 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.
10. Smedman A, Vessby B, Basu S. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by α -tocopherol and cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin Sci.* 2004; 106(1):67-73.
11. 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; 1736:244-50.
12. Arab K, Rossary A, Soullère L, Steghens JP. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Brit J Nutr.* 2006; 96:811-819.
13. Belury MA, Kempa-Steczko A. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. *Lipids* 1997;32:199-204.
14. Cherian G, Holsonbake TB, Goeger MP, Bildfell R. Dietary CLA alters yolk and tissue FA composition and hepatic histopathology of laying hens. *Lipids* 2002; 37:751-757.
15. Association Of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. 16. ed. CUNNIF, P., ed. Virgínia: AOAC International, 1995. v. 1.
16. Sinnhuber RO, Yu TC. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol.* 1958; 12:9-12.

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

17. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GCJ. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr.1993; 123:1939-51.

18. Goena M, Mazo F, Fernández-González L, Tosar A, Fruhbeck G, Santidrián S. Effect of the raw legume *Vicia ervilha* on muscle and liver protein metabolism in growing rats. Rev Española Fisiol. 1989; 45:55-60.

19. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extration and purification. Can J Biochem Physiol. 1959; 37: 911-17.

20. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta. 1991; 196:143-52.

21. Behmer OA, Tolosa EMC, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: Edart Editora da Universidade de São Paulo; 1976.

22. SAS Institute Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary: USA inst., 2003

23. Yang L, Leung LK, Huang Y, Chen ZY. Oxidative stability of conjugated linoleic acid isomers. J Agric Food Chem. 2000; 48:3072-76.

24. Tsuzuki T, Igarashi M, Iwata T, Ymauchi-Sato Y, Yamamoto T, Ogita K, Suzuki T, Miyazawa T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α -tocopherol. Lipids. 2004; 39(5):475-480.

25. Miyazawa T, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M. Fatty acids with conjugated unsaturation: relationship between oxidative stability and physiological activities. Lipid Technol. 2005; 17(10):221-25.

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípides totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípides biológicos de ratos Wistar

26. Ha YL, Storkson J, Pariza M. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated linoleic acid. *Cancer Res.* 1990; 50:1097-1101.
27. Flintoff-Dye NL, Omaye ST. Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. *Nutr Res.* 2005; 25:1-12.
28. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Bio Med* 2000; 28:505-13.
29. Cherian G, Goeger MP. Hepatic lipid characteristics and histopathology of laying hens fed CLA or n-3 fatty acids. *Lipids* 2004;39:31-36.
30. Macarulla MT, Fernández-Quintela A, Zabala A, Navarro V, Echevarría E, Churrua I, et al. Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. *Nutrition* 2005;21:512-519.
31. 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 α . *J Lipid Res.* 1999; 40:1426-33.
32. 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 Nutr.* 2000; 130(8):1920-24.
33. Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Leesnitzer LM, Blanchard SG. Conjugated linoleic acid is na activator and ligand for peroxissome proliferator-activated receptor-gama (PPAR γ). *Nutr Res.* 2002; 22:817-24.
34. 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 Bioph Res Co.* 2003; 303(3):795-799.

Artigo III: Suplementação com ácido linoléico conjugado: estabilidade oxidativa dos suplementos e correlações com conteúdo dos lípidos totais hepáticos e indicadores da oxidação dos lípidos biológicos de ratos Wistar

35. Cimini AM, Cristiano L, Colafarina S, Benedetti E, Di Loreto S, Festuccia C, Amicarelli F, Canuto RA, Cerù MP. PPAR γ -dependent effects of conjugated linoleic acid in the human glioblastoma cell line (ADF). *Int J Cancer*. 2005; 117:923-33.
36. 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; 25:454-65.
37. Ringseis R, Müller A, Herter C, Gahler S, Steinhart H, Eder K. CLA isomers inhibit TNF α -induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR γ ligand-like action. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1760:290-300.

4. CONCLUSÃO GERAL

Quanto aos resultados a respeito da influência das misturas comerciais de CLA sobre o processo de oxidação dos lípides biológicos dos ratos pôde-se chegar às seguintes conclusões:

- Com relação aos valores médios de peróxido não houve diferenças significativas entre os grupos, já com relação aos valores médios de MDA esses foram significativamente menores nos grupos que receberam suplementação;
- Quanto aos resultados de 8-iso-PGF_{2α}, isoprostana, foram observados valores significativamente menores e maiores para os grupos suplementados em relação ao grupo controle, indicando que a influência do ácido linoléico conjugado sobre a autooxidação lipídica, avaliada por este indicador, é dependente do tipo de suplemento; as correlações obtidas entre o consumo de CLA e 8-iso-PGF_{2α}, isoprostana foram positivas, porém não significativas;
- Os valores médios que expressam a atividade da catalase sérica foram significativamente menores nos grupos suplementados em relação ao grupo controle;
- Quanto à suplementação com vitamina E, essa foi eficiente particularmente no grupo controle para os indicadores catalase e 8-iso-PGF_{2α}, isoprostana;
- Os resultados dos indicadores da autooxidação lipídica mostraram-se dúbios, mas permitiram concluir que a suplementação com CLA influenciou o processo de oxidação dos lípides biológicos de diferentes maneiras, sendo esta influência

dependente do tipo de suplemento, dose do suplemento e indicador utilizado incluindo local e metodologia de determinação.

No que diz respeito aos resultados sobre influência das misturas comerciais de CLA no conteúdo dos lípidos totais e morfologia do fígado dos ratos pôde-se chegar as seguintes conclusões:

- Quanto ao conteúdo dos lípidos totais hepáticos, esse não aumentou com o consumo de CLA; houve, embora baixa, uma correlação negativa entre essas variáveis;
- Por meio da análise das imagens obtidas por MET observou-se que a suplementação com as misturas comerciais de CLA promoveu o aumento dos glóbulos de gordura em número e tamanho no fígado dos ratos, mas não alterou a morfologia do órgão visto a integridade tanto do citoplasma quanto das organelas celulares;

Após análise dos resultados obtidos, é pertinente arriscar uma pergunta que poderá abrir as portas para a continuidade da Pesquisa: 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 certamente delineará novas perspectivas para as pesquisas com CLA. 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 grande maioria dos estudos apresentam 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?

No presente estudo, de curto prazo, foi demonstrado que o CLA influencia o processo de autoxidação dos lípides biológicos; dependendo 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 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 no presente experimento, que tiveram seus valores aumentados com a suplementação de CLA. 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 no sentido de preencher muitas lacunas da medicina e da nutrição clínica.

5. APÊNDICES

APÊNDICE A - PROPÓSITO, DESENHO EXPERIMENTAL E RESULTADOS REFERENTES AO ENSAIO BIOLÓGICO PRELIMINAR.

PROPÓSITO: realizou-se um ensaio biológico preliminar cujo objetivo foi padronizar a quantidade de CLA a ser administrada assim como os aspectos operacionais da suplementação. A mistura comercial utilizada foi escolhida com base na facilidade de sua aquisição no mercado local e as quantidades testadas foram escolhidas levando-se em consideração a amplitude dos valores utilizados na literatura.

SUPLEMENTOS: os suplementos utilizados foram Ácido Linoléico 60 % e a mistura de Ácido Linoléico Conjugado AdvantEdge® CLA 75 % EASTM sendo o primeiro obtido da Sigma código L1376 e o segundo no mercado local.

ANIMAIS E DIETAS: ara a realização deste ensaio foram utilizados 50 ratos Wistar, albinos, machos, saudáveis, recém-desmamados com idade entre 21 e 23 dias, com peso médio de 52,4±4,34 g, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas. Durante todo o experimento os animais permaneceram em gaiolas de aço inoxidável individuais de crescimento com água e alimentação sob o sistema de livre acesso, sendo a temperatura e a umidade do ar controladas na faixa de 22 ± 1 °C e 60-70 % respectivamente e ciclo de claro/escuro de 12 horas. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA – IB/UNICAMP) – Protocolo nº 564-1 (ANEXO A). A dieta utilizada foi a AIN93G elaborada conforme o “American Society for Nutrition” (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) com correção da concentração de proteína bruta para 12 % (GOENA et al., 1989).

DESENHO EXPERIMENTAL: após um período de 7 dias de adaptação às condições do ensaio foram descartados 10 animais objetivando a homogeneidade de peso corporal tanto intra quanto intergrupo. Os animais restantes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 10 ratos cada constituindo o grupo C (controle) o qual recebeu ácido linoléico na concentração de 2 % sobre o consumo diário de dieta e os grupos experimentais AE1, AE2 e AE4 os quais receberam ácido linoléico conjugado nas concentrações de 1 %, 2 % e 4 % sobre o consumo diário de dieta, respectivamente. O acompanhamento do ganho de peso assim como o consumo de dieta foi realizado a cada dois dias.

SUPLEMENTAÇÃO: Os animais foram suplementados por meio de entubação orogástrica utilizando seringas descartáveis de 1 mL e agulhas de gavagem. A quantidade de suplemento administrada era calculada a cada dois dias com base no consumo médio diário de dieta de cada grupo, sendo assim a suplementação acompanhou a ingestão de dieta normal dos ratos. Levou-se em consideração a densidade de cada suplemento para o cálculo da quantidade em mililitros, que variou de 0,11 a 0,58 mL. Os suplementos eram aspirados pela seringa e mantidos ao abrigo da luz até o momento da administração. Os ratos eram retirados grupo a grupo da sala de experimentação, acondicionados em caixas plásticas e levados a sala em que eram suplementados. Este procedimento ocorria diariamente as 14:00 horas, visto que os roedores possuem hábitos noturnos e neste horário eles estavam menos saciados.

ANÁLISE CENTESIMAL DA DIETAS: as análises de umidade, proteína total e cinzas da dieta experimental foram realizadas segundo os métodos 930.15, 942.05 e 954.01 respectivamente, descritos pela Association of Official Analytical Chemists (1995). Utilizou-se 6,38 como fator de conversão de nitrogênio total para proteína. Os lípidios totais foram determinados por Bligh e Dyer (1959).

OBTENÇÃO DO SORO DO SANGUE DOS ANIMAIS PARA A DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA: o sangue dos animais foi coletado por meio de punção cardíaca, após jejum de 12 horas ao final do experimento. As amostras de sangue foram coletadas com seringas de 10 mL e escoadas suavemente sem a agulha pela parede dos tubos de polietileno sem anticoagulante previamente identificados. Os tubos repousaram em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos (adaptado de CARVALHO, 1999). Posteriormente, o soro sobrenadante foi separado, utilizando-se uma pipeta e armazenado em micro tubos de polipropileno em Freezer Ultra Low a -80 °C até o momento das análises.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS (PRODUTOS PRIMÁRIOS): Para a determinação do índice de peróxidos foi necessária a extração prévia dos lípidios do fígado de cada rato, a qual foi feita utilizando o método de Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações em decorrência de particularidades da amostra. Para a extração dos lípidios cerca de 1 g de amostra foi homogeneizada com 5 mL de clorofórmio, 10 mL de metanol e 4 mL de água, seguida de agitação rotativa e contínua durante 30 minutos. Após esta etapa adicionou-se 5 mL de clorofórmio e 5 mL da solução de sulfato de sódio 1,5 % em água,

seguida de agitação vigorosa e contínua durante 2 minutos. Nota-se, em comparação com o método original, que as quantidades dos solventes foram reduzidas, devido a quantidade de amostra disponível, no entanto, as proporções dos solventes antes e após a diluição dos lípidios foram mantidas, ou seja, 1:2:0,8 e 2:2:1,8 respectivamente. Sendo assim, a formação do sistema bifásico aconteceu sem que os lípidios ficassem excessivamente diluídos na camada clorofórmica. Após a diluição e separação completa das fases, a camada superior metanólica contendo água e os compostos não lipídicos foi succionada e a camada inferior clorofórmica contendo os lípidios totais foi filtrada em papel de filtro quantitativo para obtenção da solução límpida. Ao final deste procedimento obteve-se os lípidios diluídos em 10 mL de clorofórmio. Deste volume transferiu-se 2 mL, em duplicata, para uma placa de petri previamente tarada, o qual foi levado para a estufa a 100 °C para a evaporação do solvente. Após o resfriamento em dessecador as placas foram pesadas e a porcentagem de lípidios totais foi calculada.

Com o volume restante e imediatamente após a extração dos lípidios realizou-se a determinação do índice de peróxidos utilizando o método oficial da AOAC (1995), o qual é baseado na oxidação do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes na amostra, assumindo-se que todas as substâncias oxidantes presentes na amostra são peróxidos. Para esta análise, 2 mL de amostra em duplicata, foram dissolvidos em 30 mL da solução de ácido acético:clorofórmio (3:2). Em seguida adicionou-se 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturada deixando a reação ocorrer por 1 minuto e então adicionou-se 30 mL de água destilada fervida. Utilizando 0,5 mL de solução de amido 1 % em água como indicador realizou-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,02 N previamente padronizado. Para o cálculo do índice de peróxidos foi considerada a quantidade de lípidios presente na solução clorofórmica resultante do procedimento de extração dos lípidios segundo Bligh e Dyer (1959).

DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO: A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi feita no soro e no fígado de cada animal utilizando 1,5 mL e cerca de 0,2 g de amostra respectivamente e em triplicata. O método utilizado para esta análise foi o proposto por Sinnhuber & Yu (1958), que tem como princípio básico a formação de um pigmento vermelho-róseo composto por 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico e 1 de malonaldeído, cuja absorbância pode ser lida em luz visível no comprimento de onda de 535 nm. O procedimento consistiu na administração das quantidades de amostra referidas acima em balões de fundo redondo de 250 mL, seguida da

adição de 5 mL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,1N, 5 mL de água, 5 mL de ácido clorídrico 0,6 N e 10 mL da solução de ácido tricloroacético 20 % em água. Os balões foram conectados aos condensadores e procedeu-se a destilação por refluxo durante 30 minutos em banho-maria fervente. Após esta etapa, acrescentou-se 75 mL de ácido clorídrico 0,6 N e continuou-se o refluxo por mais 10 minutos. Posteriormente a solução foi filtrada em papel de filtro quantitativo e lida a 535 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70, utilizando a solução de ácido 2-tiobarbitúrico para calibração e os resultados foram expressos em mg de malonaldeído/kg de amostra.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de teste de Tukey, ao nível de significância de 5 %. O *software* utilizado para a análise foi o *Statistical Analysis System* (SAS).

A seguir serão apresentados os resultados e a conclusão do ensaio:

Tabela 1. Composição centesimal (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) das dietas experimentais do ensaio biológico preliminar.

Componente químico	Conteúdo
	Valor Médio $\pm$ Desvio Padrão
Umidade	2,77 $\pm$ 0,08
Proteína bruta	12,29 $\pm$ 0,29
Lípides totais	7,15 $\pm$ 0,04
Cinzas	2,70 $\pm$ 0,08
Carboidratos *	75,06
Valor energético **	413,75

* A determinação de carboidratos foi feita por diferença

** O cálculo foi feito da seguinte maneira: (proteína bruta x 4) + (lípidos totais x 9) + (carboidratos x 4)

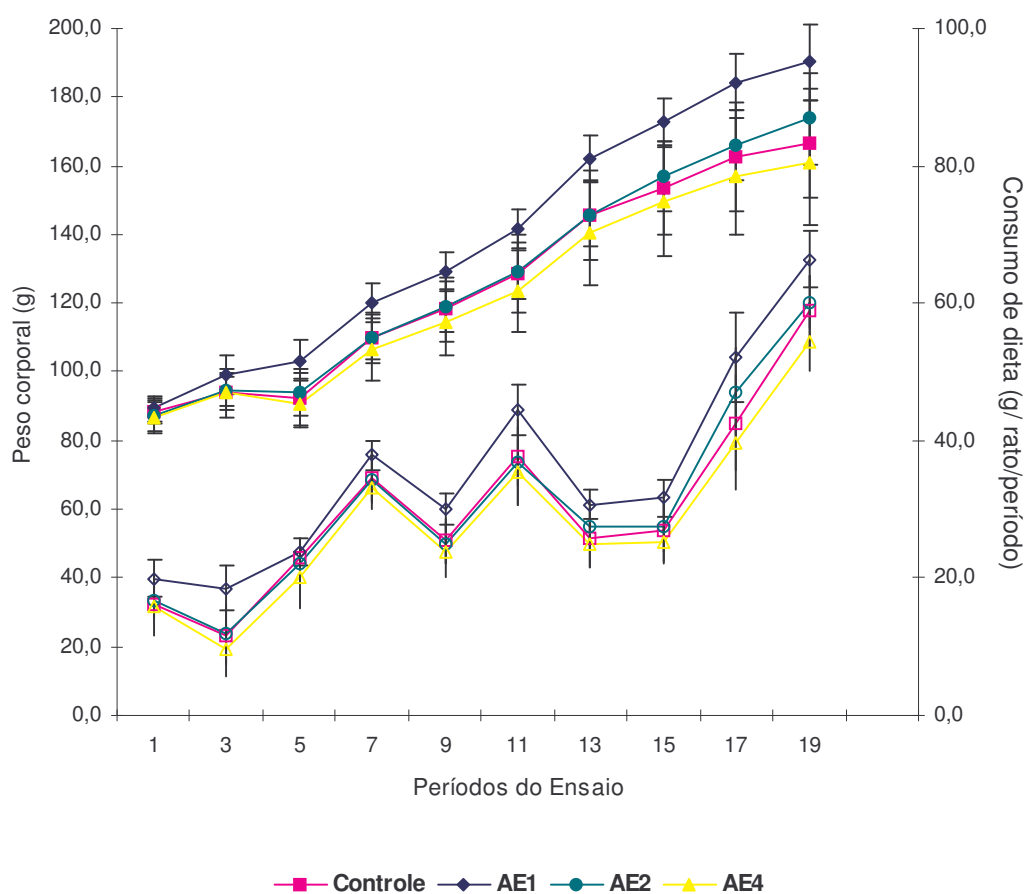


Figura 1. Peso corporal e consumo de dieta dos ratos do grupo controle e experimentais (n=10) no ensaio biológico preliminar.

Marcadores cheios representam valores referentes ao peso médio (g);

Marcadores vazios representam valores referentes ao consumo médio de dieta (g) no período de dois dias.

Tabela 2. Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n = 10) do consumo de dieta, ganho de peso e eficiência alimentar dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.

Grupos	Consumo (g)	Ganho de peso (g)	Eficiência Alimentar
C	241,4 $\pm$ 22,9 ^a	78,4 $\pm$ 16,1 ^a	0,32 $\pm$ 0,04 ^a
AE1	285,6 $\pm$ 17,9 ^b	99,0 $\pm$ 8,4 ^b	0,35 $\pm$ 0,02 ^a
AE2	243,0 $\pm$ 23,5 ^a	83,4 $\pm$ 13,0 ^{a,b}	0,35 $\pm$ 0,03 ^a
AE4	230,0 $\pm$ 23,8 ^a	75,8 $\pm$ 17,7 ^a	0,32 $\pm$ 0,04 ^a

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05) ao teste de Tukey

Tabela 3. Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n=5) do conteúdo de lipídios totais do fígado dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.

Grupos	Lipídios totais [*] (%)
C	19,59 $\pm$ 1,23 ^a
AE1	19,56 $\pm$ 2,40 ^a
AE2	17,83 $\pm$ 0,71 ^a
AE4	19,49 $\pm$ 2,43 ^a

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05) ao teste de Tukey

* Valores expressos em base seca

Tabela 4. Valores médios $\pm$ desvio-padrão (n=5) de índice de peróxido (IP) hepático e de malondialdeído séricos e hepáticos dos grupos controle e experimentais do ensaio preliminar.

Grupos	IP*	MDA*	
	Fígado	mg de MDA**/kg de amostra	
	mEg/kg de lípide	Soro	Fígado
C	52,22 $\pm$ 16,6 ^a	1,41 $\pm$ 0,21 ^a	8,61 $\pm$ 0,78 ^a
AE1	76,07 $\pm$ 16,12 ^{ab}	1,88 $\pm$ 0,39 ^a	6,57 $\pm$ 1,35 ^b
AE2	109,19 $\pm$ 17,39 ^{ab}	1,70 $\pm$ 0,42 ^a	7,12 $\pm$ 0,80 ^{a,b}
AE4	129,57 $\pm$ 37,76 ^b	1,35 $\pm$ 0,21 ^a	7,25 $\pm$ 0,59 ^{a,b}

Valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p>0,05) ao teste de Tukey

* Valores expressos em base seca

** Malondialdeído

Com base nos resultados obtidos e nas condições de suplementação padronizadas nesse ensaio chegou-se a conclusão de que a concentração de 2 % de CLA sobre o consumo de dieta seria a utilizada no ensaio definitivo. Frente aos resultados sobre o efeito da suplementação com CLA sobre a autoxidação lipídica, obtidos nesse ensaio preliminar foi possível observar que o CLA influencia o a processo de oxidação dos lípides biológicos, porém, sem clareza quanto ao efeito antioxidante ou pró-oxidante, visto que os valores médios de IP hepático foram maiores, já os de MDA hepático foram menores que o controle.

APÊNDICE B - DADOS ADICIONAIS REFERENTES AO ENSAIO BIOLÓGICO DEFINITIVO.

Os resultados da análise da composição centesimal do ensaio biológico definitivo que não estão apresentados nos artigos originais que compõem essa Tese estão descritos a seguir:

Tabela 5. Composição centesimal (g/100g) e valor energético (Kcal/100g) das dietas experimentais do ensaio biológico definitivo.

Componente químico	Conteúdo
	Valor Médio $\pm$ Desvio Padrão
Umidade	3,03 $\pm$ 0,41
Proteína bruta	12,39 $\pm$ 0,31
Lípides totais	7,11 $\pm$ 0,09
Cinzas	2,65 $\pm$ 0,06
Carboidratos *	74,79
Valor energético **	412,71

* A determinação de carboidratos foi feita por diferença

** O cálculo foi feito da seguinte maneira: (proteína bruta x 4) + (lípides totais x 9) + (carboidratos x 4)

6. ANEXOS

**ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL**



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEAB-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAB-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 564-1, sobre "A SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO E PERFIL LIPÍDICO, COMPOSIÇÃO CORPORAL E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM RATOS", sob a responsabilidade de Prof. Dr. ADMAR COSTE DE OLIVEIRA/ADRIANA PRAIS BOTELHO/LILIA ZAGO F. SANTOS está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAB)-IB-UNICAMP em reunião de 06 de Junho de 2003.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 564-1, entitled "CONJUGATED LINOLEIC ACID SUPPLEMENTATION AND BLOOD FAT, BODY COMPOSITION AND LIPID PEROXIDATION IN RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on June 6, 2003.

Campinas, 06 de Junho de 2003.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente
CEEAB/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária Executiva
CEEAB/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ
Caixa Postal 6109
CEP -13083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE: (19) 3788-6359
FAX 55 19 32893124

**ANEXO B – SEPARATA E PROTOCOLOS DE SUBMISSÃO DOS ARTIGOS
ORIGINAIS**

Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autooxidation in Rats

Lilia Ferreira Santos-Zago · Adriano Peiris Botelho ·
Admar Costa de OliveiraReceived: 6 February 2007 / Accepted: 29 May 2007 / Published online: 31 July 2007
© AOCs 2007

Abstract CLA has been studied for its beneficial effects on health. However, the possibility of adverse effects, such as increased oxidative stress, must also be considered. The present work aims to assess the effect of CLA supplementation on the process of lipid autooxidation, both in the presence and in absence of an antioxidant. The investigation consisted in a biological assay with 60 rats divided into six groups: C (control), CE (control + vitamin E), AE (AdvanEdge®CLA), AEE (AdvanEdge®CLA + Vitamin E), CO (CLA One®) and COE (CLA One® + vitamin E). The CLA amount was 2% of food consumption. Animals were supplemented for 42 days. As indicators of lipid autooxidation, peroxide (IP), malondialdehyde (MDA), 8-iso-PGF_{2α}, isoprostane and catalase were determined. Hepatic IP results indicated that CLA increased oxidation values for CLA-supplemented groups, particularly group CO (84.38 ± 10.97 mequiv/kg), were higher than those of the control group (54.75 ± 9.70 mequiv/kg). In contrast, serum MDA results showed that CLA reduces oxidation both for group AE (18 ± 0.67 ng of MDA/l) and for group CO (2.43 ± 0.61 ng of MDA/l) as compared to the control group (38.5 ± 0.24 ng of MDA/l). Serum catalase indicated a reduction of oxidation: groups AE and CO displayed 4734.23 ± 1078.93 kU/l and 5916.06 ± 2400.71 kU/l, respectively. These values are significantly lower than those of the control group. An increase in 8-iso-PGF_{2α} in urine was observed, particularly in group AE (95.13 ± 20.26 pg/ml) as compared to the control group (69.46 ± 16.65 pg/ml). It was concluded that the influence

of CLA on lipid autooxidation is dependent on supplement type, supplement dosage and chosen indicator, including its tissue and determination methodology.

Introduction

Conjugated linoleic acids (CLA), a group of position and geometrical isomers with conjugated double bonds of the octadecadienoic acid (C18:2), is found in small amounts in a large variety of foods, and it is estimated that there are 56 possible isomers [1, 2].

Interest for conjugated linoleic acid (CLA) arose in 1979 when researchers found antimutagenic and anticarcinogenic substances, among them CLA, in grilled meats [3, 4]. Subsequently, numerous works demonstrated other beneficial health effects of CLA, including body composition change, reduction of arteriosclerosis, prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus, enhancement of bone mineralization, immune system modulation, and an anti-thrombotic effect [1]. Adverse effects of CLA supplementation have also been studied, particularly regarding increased susceptibility to lipid autooxidation [5–8]. CLA can be synthesized by ruminants by the biohydrogenation of unsaturated fatty acids by bacteria present in the rumen, in such a way that the predominant isomer is *cis*-9, *trans*-11 [9, 10]. The *cis*-9, *trans*-11 CLA isomer can be produced in mammary glands by the delta 9 desaturase path. The *trans*-10, *cis*-12 isomer is also believed to be one of the isomers synthesized in the rumen of polygastroic animals [11]. Thus, significant concentrations of CLA, especially *cis*-9, *trans*-11 CLA, can be found in meats, milk, and their products [12].

L. F. Santos-Zago (✉) · A. P. Botelho · A. C. de Oliveira
Laboratory of Lipids, Department of Food and Nutrition,
College of Food Engineering, State University of Campinas,
P.O. Box 661, Campinas, SP 13063-660, Brazil
e-mail: zago@fca.unicamp.br

Numerous commercial mixtures of CLA and its isomers have been studied for their physiological effects. The *cis-9, trans-11* and the *trans-10, cis-12* isomer is more closely related to lipid and glucose metabolism and body fat reduction [13], whereas the *cis-9, trans-11* isomer is associated to antioxidant and anticarcinogenic effects [14, 15].

Although CLA physiological effects have been widely studied, some of them are not completely elucidated, and further investigation is needed, particularly concerning biological lipid oxidation [6, 7, 16].

With the aim of investigating the influence of CLA on the lipid oxidation process, many compounds with specific chemical structures that lead themselves to determination by various methods are used as biological indicators. They may result from autooxidation or from the action of enzymes (cyclooxygenases and lipoxygenases). Quantification of primary and secondary autooxidation products, such as peroxides and malondialdehyde, respectively, or products of enzymatic oxidation such as 8-iso-PGF_{2α}, isoprostane, has been used to assess the degree of oxidative stress in biological systems subjected to CLA supplementation [6–8]. The determination of the activity of antioxidant enzymatic systems such as catalase is also used as a parameter to evaluate biologic lipid oxidation in CLA assays [5]. In view of a possible pro-oxidant action of CLA resulting from the fact that it is a conjugated diene, there is a hypothesis that its supplementation in association with the antioxidant protection provided by vitamin E could minimize the deleterious action of CLA on the process of biological lipid oxidation. Thus, the objective of the present study is to assess the effects of conjugated linoleic acid supplementation, both in the presence and in the absence of vitamin E, on the process of lipid autooxidation in healthy growing Wistar rats.

Materials and Methods

Supplements

Supplements used were linoleic acid 60% Sigma (code L 1376), the conjugated linoleic acid commercial mixtures 75% AdvantEdge® CLA (EAS™, Golden, CO, USA) and 75% CLA One® Free Fatty Acid Oil ICLA1-FFBL-KG (Pharmnutrients, Gurnee, IL, USA), and α - α -tocopherol acetate Ephyra® (Roche Brasil). Fatty acid composition of the linoleic acid supplement 60% Sigma (code L 1376) and the commercial conjugated linoleic acid mixtures 75% AdvantEdge® CLA (EAS™), and 75% CLA One® Free Fatty Acid Oil ICLA1-FFBL-KG (Pharmnutrients), expressed in g/100 g of fatty acids, can be seen in Table 1.

Animals and Diets

For biological assays, albino male healthy recently weaned Wistar rats were used, aged 21–23 days, with a mean weight of 99.7 ± 5.84 g, from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation, State University of Campinas. Animals remained in individual growth cages for 38 days, and in individual metabolic cages for 4 days for urine collection. They received water and food ad libitum; temperature and humidity were kept in the ranges of 22 ± 1 °C and 60–70%, respectively, and the light/dark cycle was of 12 h. This work has been approved by the Animal Experiment Ethics Commission (CEEA - IB/UNICAMP, Protocol no. 564–0). Diet was powdered AIN93G, prepared according to the American Society for Nutrition [17], with a protein concentration of 12% [18]. The diet protein concentration was changed to 12% because this is a work on dietetic manipulation, and a diet with the original protein concentration would make it more difficult to observe the differences in animal growth that might result from CLA supplementation (Table 2).

Experimental Design

The biological assay experimental protocol was as follows. Sixty rats remained in an adaptation period for 7 days, receiving the respective diets and drinking water ad libitum. After this period, animals were randomly divided into six groups of ten animals each in order to achieve body weight homogeneity within and across groups. Experimental groups were divided as follows: group C (control) received 60% linoleic acid; group CE received linoleic acid + α - α -tocopherol acetate; group AE received AdvantEdge® CLA; group AEE received AdvantEdge® CLA + α - α -tocopherol acetate; group CO received CLA One® Free Fatty Acid Oil; and group COE received CLA One® Free Fatty Acid Oil + α - α -tocopherol acetate. Supplement dosage was 2% of daily food consumption, and α - α -tocopherol acetate dosage was 30 mg/day. Animals were supplemented daily for 6 weeks. Body weight and food consumption were determined every 2 days. The following determinations were done: hepatic peroxide index (primary lipid autooxidation products), serum and hepatic malondialdehyde (secondary lipid autooxidation products), plasma and urine 8-iso-PGF_{2α}, isoprostane, and serum catalase activity. As described above, in the last four assay days animals remained in metabolic cages for urine collection. Lipid oxidation indicators were determined for eight animals of each group, because that was the number of available metabolic cages. For blood determinations, six samples were used, as two were discarded due to hemolysis.

Table 1 Fatty acid composition of linoleic acid and commercial conjugated linoleic acid mixtures (g/100 g of fatty acids)

Fatty acids	Linoleic acid 60% sigma (code L 1376)	Conjugated linoleic acid 75% sigma (code L 1376)	CLA one ^a free fatty acid oil 75% 1CLA1-PPHLE-EG (Pharmaceuticals)
C8:0	–	0.02	0.05
C10:1	–	0.01	–
C12:0	–	0.01	–
C14:0	0.13	–	–
C16:0	0.02	–	–
C16:1 <i>cis</i> -9	2.89	2.15	3.36
C17:0	0.17	0.01	–
C17:1	0.04	0.03	–
C18:0	0.07	0.01	–
C18:1 <i>cis</i> -9	0.80	2.96	1.91
C18:1 <i>cis</i> -9	25.90	13.23	16.06
C18:1 <i>cis</i> -11	2.06	1.04	0.96
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	58.64	0.75	0.95
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.09	40.12	36.31
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.08	38.15	36.27
C18:2 <i>cis</i> -11, <i>trans</i> -12 CLA	–	–	1.48
C18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -12	0.82	0.21	0.47
C18:3	–	0.06	0.13
C20:0	1.01	–	–
C20:1	–	0.06	0.13
C20:2	6.18	0.01	–
C20:3	–	0.04	–
C20:4	0.01	–	–
C20:5	0.01	0.02	0.05
C22:0	–	0.04	0.07
Total	100.00	100.00	100.00

CLA conjugated linoleic acid

Supplementation

Animals were supplemented by orogastric intubation with 1 ml, disposable syringes and gauge needles. The amount of supplement was calculated every other day on the basis of the average feed consumption of each group, so that supplementation followed normal feed ingestion. The amount of supplement varied from 0.25 to 0.49 ml, and was calculated with help of the density. Supplements were aspirated with the syringe and kept away from light till the moment of administration. For the groups receiving DL- α -tocopherol acetate, this product was aspirated into the syringe before linoleic acid and conjugated linoleic acid supplements, and administered with the same syringe. Rats were removed group by group from the experiment room, placed in plastic boxes, and taken to the supplementation room. This procedure was done daily during daytime and always at the same time, since rodents have nocturnal habits.

Determination of Fatty Acid Profiles of Linoleic Acid and Conjugated Linoleic Acid Mixtures

Methylation followed the Christie method [19]. About 50 g of each sample were weighed in conic bottom graduated

Table 2 Mean values $\pm$ standard deviation ($n = 10$) of feed consumption, weight gain and feed efficiency of experimental and control groups over the 6-week intervention period

Groups	Consumption (g)	Weight gain (g)	Feed efficiency
C	631.2 $\pm$ 48.7 ^{a,b}	192.5 $\pm$ 27.2 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
CE	586.6 $\pm$ 41.0 ^b	166.3 $\pm$ 14.2 ^b	0.28 $\pm$ 0.01 ^b
AE	645.7 $\pm$ 27.6 ^a	203.5 $\pm$ 17.9 ^a	0.31 $\pm$ 0.01 ^a
AEE	641.9 $\pm$ 55.4 ^{a,b}	194.6 $\pm$ 27.2 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^{a,b}
CE	621.9 $\pm$ 30.9 ^{a,b}	187.0 $\pm$ 10.4 ^b	0.30 $\pm$ 0.01 ^{a,b}
CEE	625.3 $\pm$ 53.8 ^{a,b}	195.2 $\pm$ 22.7 ^a	0.31 $\pm$ 0.01 ^b

Values not sharing similar letter in the same column are different ($P < 0.05$) in the Tukey test

extraction tubes. Then 2 mL of 1% methanolic sulphuric acid were added. Tubes were capped and shaken in an electric agitator for 1 min. Tubes remained in water bath for 2 h; 5 mL of sodium chloride 5% were added, followed by 1 min shaking. 5 mL of hexane were added, and tubes were again shaken for 30 s. The supernatant (hexane and methyl ester) was transferred to another extraction tube, to which 4 mL of 5% potassium bicarbonate were added. Tubes were shaken in an electric agitator for 1 min, and phase separation occurred rapidly. The new supernatant was transferred to another extraction tube containing 1 g of sodium sulphate. The hexane was evaporated with help of a nitrogen flux under water bath at 40 °C. Finally, 2 mL of hexane were added, and the solution was transferred to a chromatography vial, labeled, and stored at -20 °C. Fatty acid profile was determined by gas chromatography with a capillary silica column CP 581, 88 (0.25 mm × 0.2 µm × 100 m) and a flame ionization detector (FID). A temperature gradient with initial temperature of 70 °C was used for 4 min, followed by an increase at the rate of 13 °C/min until 175 °C; after 27 min the temperature was raised again at the rate of 4 °C/min, to 240 °C where it remained for 4 min, totaling 70 min for the whole run. Injector and detector temperatures were 250 and 300 °C, respectively. Injection was in split mode with ratio of 90:1. The carrier gas was hydrogen with a flux of 1.8 mL/min, and pressure of 36.3 psi at the column head [20]. Results were expressed in percentage of total fatty acids. The standard adopted was CRM-164 (Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), which has certified values for 11 fatty acids; they were used to establish the correction factor for each certified fatty acid in order to transform the peak expressed in percentage of area into mass (mg/g total fatty acids).

Collection of Serum and Plasma from Blood and Urine of Animals for Determination of Lipid Autooxidation Indices

Blood from the animals was collected under anaesthesia (sodium pentobarbital, Hypnol 3%, 46 mg/kg), by cardiac puncture after a 12-h fast at the end of each experiment. Blood samples were collected with 10 mL syringes and gently poured, without the needle, down the walls of polyethylene tubes, without anticoagulant for serum, and with anticoagulant for plasma. Tubes remained in a water bath at 37 °C for 30 min, and centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. After that, supernatant serum and plasma were separated with a pipette, and stored in polypropylene microtubes in an Ultra Low Freezer at -80 °C until analysis. Urine was collected in 25 mL graduated cylinders with 1 mL of 20% sulfuric acid, kept for a period of 24 h, filtered, and stored at -80 °C until analysis.

Peroxide Index (Primary Lipid Autooxidation Products)

For the determination of the peroxide index, lipids were previously extracted from the liver of each rat by the method of Bligh and Dyer [21] with some modifications due to sample peculiarities. About 1 g of sample was homogenized in 5 mL of chloroform, 10 mL of methanol, and 4 mL of water, followed by continual rotary agitation for 30 min. After this, 5 mL of chloroform and 5 mL of 1.5% sodium sulphate aqueous solution were added, and the sample was vigorously and continually shaken for 2 min. After dilution and complete separation of phases, the upper methanol layer containing water and non-lipid compounds was aspirated, and the lower chloroform layer containing total lipids was filtered in quantitative paper filter to obtain a clear solution. Immediately after lipid extraction, peroxide index determination was performed according to the official AOAC method [22], which is based on the oxidation of iodine in the presence of potassium iodide by the peroxide present in the sample, assuming that all oxidizing substances in the sample are peroxides. For the computation of the peroxide index, the amount of iodine present in the chloroform solution resulting from the lipid extraction procedure of Bligh and Dyer [21] was used.

Malondialdehyde, MDA (Secondary Lipid Autooxidation Products)

Determination of thiobarbituric acid reactive substances was done for the serum and liver of each animal using about 1.5 mL and 0.2 g of samples, respectively, in triplicate. The method chosen for this analysis was proposed by Simidubee, Yu [23], and its basic principle is the formation of a pinked pigment composed of two molecules of thiobarbituric acid and one molecule of malondialdehyde (MDA). Its absorbance was read in visible light with a wavelength of 535 nm, using a 1% solution of 2-thiobarbituric acid for calibration; results were expressed in mg malondialdehyde per kg of sample.

Determination of 8-iso-PGF₂, isoprostane

Determination of 8-iso-PGF₂, isoprostane in plasma and urine of the rats was done by enzyme immunoassay using a commercial kit from Cayman Chemical, catalog number 516351. The method is based in the competition between 8-iso-PGF₂, isoprostane and conjugated 8-iso-PGF₂, isoprostane-acetylcholinesterase (marker) by a limited number of binding sites for the specific antiserum of 8-iso-PGF₂, isoprostane. Results were expressed in pg/mL of sample.

Catalase Activity Determination

For the catalase activity determination, the methodology described by Góth [24] was used. It consists in the determination of serum catalase by the reaction with hydrogen peroxide. Determination was performed as follows: 0.2 mL of serum were incubated in a substrate solution composed of hydrogen peroxide (65 μ mol) in phosphate buffer (60 mmol/L, pH 7.4), for 1 min at 37 °C. After the incubation period, the reaction was interrupted by adding 1.0 mL of ammonium molybdate (32.4 mmol/L). Absorbance of the yellow complex formed between ammonium molybdate and hydrogen peroxide was read at 405 nm. Results were expressed in kU/L, considering that one unit of catalase decomposes, in the conditions described above, 1 mmol of hydrogen peroxide per minute.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SD. Data were analysed statistically by ANOVA using Statistical Analysis System [25] to test the effect of CLA mixtures and the interaction between CLA mixtures and vitamin E. The effect of supplementation time on food consumption and growth was also examined. The Tukey test was used to test the differences among groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

With regard to food consumption, weight gain and food efficiency, Table 1 shows that differences were found only between groups C and AE ($P \leq 0.05$). Figure 1 represents the weight gain curve and food consumption of the rats during the period of CLA supplementation, and shows that growth was normal.

With regard to effects of CLA on lipid autooxidation, it can be said that results obtained are in agreement with the literature, i.e., there is no consensus about the real effect of this supplement on the oxidation process of biological lipids: many of the results point to the investigation of antioxidant properties, and others to the investigation of a possible pro-oxidant effect of CLA. In Table 3, the results of all lipid oxidation indicators determined in this experiment are described. There was a difference in hepatic peroxide index (IP) only between groups C and CO. Group CO did exhibit a higher IP value than group C ($P \leq 0.05$), which might suggest that the CLA One[®] supplement had a more discernible influence on the process of biological lipid oxidation as compared with the AdvantEdge[®] CLA supplement, since the group of rats receiving the latter displayed a mean peroxide value similar to the control

group, and smaller than group CO. Serum malondialdehyde average values were significantly smaller in groups receiving CLA supplementation, both for CLA One[®] and AdvantEdge[®] CLA ($P \leq 0.05$). Hepatic MDA values did not differ between control group (13.50 $\pm$ 3.23 mg/kg of sample) and groups receiving supplementation: AE (12.51 $\pm$ 2.41 mg/kg of sample) and CO (14.36 $\pm$ 0.71 mg/kg of sample). However, group AEE, which received CLA supplementation associated with vitamin E, exhibited significantly lower values ($P \leq 0.05$). Regarding the 8-iso-PGF₂ isoprostane results, differences in plasma values were observed only between groups AE and COE ($P \leq 0.05$). 8-iso-PGF₂ isoprostane values in urine for group AE were significantly higher, whereas for group CO values were significantly lower than those of the controls ($P \leq 0.05$). Such results suggest that effects on the lipid autooxidation process can be different as a result of the characteristics of each supplement. Supplements used in the present research contained 79.27 and 73.08% CLA for the brands AdvantEdge[®] CLA e CLA One[®], respectively, and the proportion between the predominant isomers *cis-9*, *trans-11* and *trans-10*, *cis-12* was approximately 1:1. The mean values expressing catalase activity were significantly lower ($P \leq 0.05$) in the groups receiving CLA, with the exception of group CO. These findings suggest the possibility of an antioxidant effect of CLA, as this enzyme plays a major role in protecting the organism against damage of oxidative stress by means of the degradation of peroxides, which result from lipid oxidation.

Discussion

Regarding food consumption and weight gain of the rats during the supplementation period, it can be said that, even though differences between some of the groups were observed at certain moments, growth was normal. Food consumption changes seen in the graph are a consequence of supplement amount correction. The administered concentration of CLA followed the food consumption, i.e., as consumption rose, supplement quantity was raised, leading to a drop in food consumption, because CLA, as a lipid, produced greater satiety in the rats. This occurred cyclically throughout the assay, but it is important to note that these oscillations did not compromise animal growth, as seen in the body weight curves (Fig. 1).

Regarding results on the influence of CLA on biological lipid oxidation, a point to be discussed is that IP results of a preliminary assay in our laboratory [26] represent a fairly strong indication of an increase of this indicator in groups receiving CLA supplementation, and those results were higher than in the present assay. The main objective of the previous assay was to standardize CLA supplementation

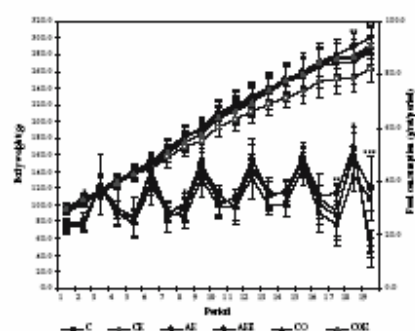


Fig. 1 Body weight (g) and feed consumption (g/day/period) in control and experimental groups ($n = 10$). Upper line represent mean weight values (g); lower line represent mean feed consumption (g) in a period of two days. C control group, CE control group with vitamin E, AE group supplemented with AdvantEdge[®] CLA, AEE group supplemented with AdvantEdge[®] CLA + vitamin E, CO group supplemented with Ono[®] CLA, COE group supplemented with Ono[®] CLA + vitamin E. *statistical difference between group CE and group AE and COE for body weight according to Tukey test ($P < 0.05$), statistical difference between group CE and groups C and CO, **statistical difference between AE and groups C and CE and ***statistical difference between groups C, AE and CO, and groups CE, AEE and COE for feed consumption according to Tukey test ($P < 0.05$)

Table 3 Mean values $\pm$ standard deviation of the hepatic peroxide index ($n = 5$), serum ($n = 6$) and hepatic ($n = 5$) malondialdehyde (MDA), plasma and urine 8-iso-PGF₂ isoprostane ($n = 6$) and serum catalase activity ($n = 6$) in control and experimental groups

Groups	Peroxide index ¹ meq/kg	MDA ng MDA/kg		8-iso-PGF ₂ isoprostane pg/ml		Serum catalase U/g
		Serum	Liver ²	Plasma	Urine	
C	54.75 $\pm$ 9.70 ^a	3.85 $\pm$ 0.24 ^a	13.50 $\pm$ 3.23 ^a	13.84 $\pm$ 3.55 ^{ab}	66.46 $\pm$ 16.65 ^a	10496.32 $\pm$ 5121.84 ^a
CE	67.39 $\pm$ 11.50 ^{ab}	2.43 $\pm$ 1.32 ^b	11.89 $\pm$ 3.90 ^a	15.29 $\pm$ 7.14 ^{ab}	56.37 $\pm$ 4.54 ^b	3827.68 $\pm$ 1131.79 ^b
AE	53.66 $\pm$ 13.55 ^{ab}	1.80 $\pm$ 0.67 ^b	12.51 $\pm$ 2.41 ^a	16.86 $\pm$ 3.41 ^a	95.13 $\pm$ 20.26 ^b	4754.23 $\pm$ 1078.93 ^b
AEE	76.16 $\pm$ 36.47 ^{ab}	1.66 $\pm$ 0.71 ^b	6.73 $\pm$ 3.45 ^b	13.54 $\pm$ 2.84 ^{ab}	73.03 $\pm$ 9.15 ^b	3328.14 $\pm$ 1567.98 ^b
CO	84.38 $\pm$ 10.97 ^b	2.43 $\pm$ 0.61 ^b	14.26 $\pm$ 0.71 ^a	13.72 $\pm$ 2.24 ^{ab}	54.20 $\pm$ 13.81 ^b	5916.06 $\pm$ 2480.71 ^{ab}
COE	72.03 $\pm$ 14.12 ^{ab}	2.17 $\pm$ 0.62 ^b	13.46 $\pm$ 2.12 ^a	16.17 $\pm$ 1.62 ^b	49.88 $\pm$ 5.51 ^b	3645.86 $\pm$ 2178.95 ^b

Values not sharing similar letters in the same column are different ($P < 0.05$) in the Tukey test

¹ Values expressed in dry basis

C control group, CE control group with vitamin E, AE group supplemented with AdvantEdge[®] CLA, AEE group supplemented with AdvantEdge[®] CLA + vitamin E, CO group supplemented with Ono[®] CLA, COE group supplemented with Ono[®] CLA + vitamin E

conditions. Growing male White rats were supplemented for 21 days with commercial conjugated linoleic acid mixture 75% AdvantEdge[®], CLA (EASTM) in the concentrations of 1, 2 and 4% of the daily feed consumption, having linoleic acid as a control. The concentration adopted for the present assay—2% of feed consumption—was chosen on the basis of results and operational conditions of

supplementation in the preliminary assay. As discussed above, the PI concentration in the present assay was higher. This observation might be explained by the duration of supplementation, which was greater in the present assay, coupled to the fact that peroxides are primary products of lipid oxidation, i.e., as supplementation time increases peroxide concentration diminishes due to their cleavage

into secondary products. This hypothesis can be confirmed by the results of malondialdehyde (MDA) shown in Table 3. Although there was no significant difference ($P > 0.05$) between control groups and those receiving CLA without vitamin E (hepatic values), mean serum and hepatic values of malondialdehyde (MDA), a representative of secondary lipid oxidation, are higher in the present assay, in which supplementation ran for a period twice as long as the previous assay [26]. Results reported above are in agreement with works regarded as crucial for the re-investigation of CLA effects on the lipid auto-oxidation process. Studies such as those by Cartmell et al. [5], Basu et al. [6] and Yamaoka et al. [7], which aimed at assessing the effect of CLA on lipid auto-oxidation, clearly point to the need for re-investigating the antioxidant properties and the possible pro-oxidant effect of CLA.

The IP and MDA results of the present work are different from those reported by some research teams that studied antioxidant and pro-oxidant properties of CLA. The previously mentioned works [5–7] found MDA results that led to the conclusion that CLA acts as a pro-oxidizing agent. In a more recent work on the effect of CLA on low-density lipoprotein oxidation, Flinck-Dye and Gruney [27] demonstrated that the four isomers under study (*cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12; *trans*-9, *trans*-11; and *cis*-9, *cis*-11) promoted a significant increase in TBARS concentration in the samples.

Regarding 8-iso-PGF₂, isoprostane, a product of non-enzymatic lipid oxidation and, according to the literature, the most specific biological indicator for the assessment of oxidative stress, results showed that when it was determined in the urine, AE supplement increased oxidation, whereas CO reduced it. Since the identification in the 1990s of series F prostaglandins, particularly 8-iso-PGF₂, isoprostane, as fairly specific indicators of lipid auto-oxidation [28], many studies aimed at assessing oxidative stress by its determination in different experimental models, including humans. Works evaluating the influence of CLA on oxidative stress using series F prostaglandin determinations as indicators have been published only recently and are still scarce. Basu et al. [29], supplementing humans with abdominal obesity with CLA for one month, found urinary values of 8-iso-PGF₂, isoprostane significantly higher than the group receiving placebo, and these values returned to basal levels after conclusion of CLA supplementation. In 2000, Basu et al. [6] categorically stated that CLA induces lipid peroxidation in humans after finding a significant increase of 8-iso-PGF₂, isoprostane in urine, about four times higher than the basal amount, after supplementation with 4.2 g of CLA for 12 weeks.

There is an ongoing debate about the action of a specific CLA isomer in promoting a certain physiological effect, such as the case of total body fat reduction, one of the most

widely studied effects of CLA, and promoted mainly by the *trans*-10, *cis*-12 [30] isomer. There is no information about which isomer is responsible for influencing lipid auto-oxidation in the studies of CLA and oxidative stress. It is believed that this influence is promoted by both predominant isomers, *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 [22]. In order to investigate whether the process of biological lipid oxidation is influenced by a specific isomer, Ristvas et al. [31] supplemented men bearing metabolic syndrome with six capsules of 3.4 g per day of CLA isomer mixture, and the isolated isomer *trans*-10, *cis*-12 for a period of 12 weeks. The authors found urine values of 8-iso-PGF₂, isoprostane 25 times higher in men receiving supplementation with a mixture of CLA than in the control group. This led to the conclusion that biological lipid oxidation is influenced by CLA, and that pure *trans*-10, *cis*-12 isomer had a more potent influence on the oxidation process. Similar results are reported in the work of Smolkin et al. [32], which aimed at understanding the mechanism, by which CLA influences the oxidation process, and whether this influence is promoted by a specific CLA isomer. In a double-blind randomized study, Ristvas et al. [8] supplemented obese men for a period of 12 weeks with 3 g/day of CLA mixture containing predominantly the *cis*-9, *trans*-11 isomer. Urine concentration of 8-iso-PGF₂, isoprostane was 50% higher after supplementation with the CLA isomer, indicating that lipid oxidation is increased not only by isomer *trans*-10, *cis*-12 but by *cis*-9, *trans*-11 as well. Although this was not the only isomer in the mixture, it corresponded to 83% of it. Flinck-Dye and Gruney [27] assessed the antioxidant and pro-oxidant properties of the CLA isomers *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 by means of the determination of LDL in human blood samples. Results indicated that both isomers influenced the lipid oxidation process in a similar way. Based on the phenomenon of homeiosis, that characterizes the change in effect according to the dosage [33], the authors point out that CLA acts in a paradoxical way, in that it initially acts as a pro-oxidant (in low concentrations), then as an antioxidant (in intermediate concentrations), and finally as pro-oxidant again (in high concentrations), but they go on to conclude that, in general, CLA is a pro-oxidant agent because of the increase of oxidative stress observed in low concentrations, when an antioxidant effect would be expected.

The lower catalase activity would indicate smaller peroxide production, which in turn would indicate a lower degree of oxidative stress. In a work by Cartmell et al. [5] aiming at assessing the effect of CLA on the enzymatic system of antioxidant defense in hepatic cells of rats, it was demonstrated that CLA promoted a significant reduction of catalase activity when hepatocytes were exposed to a higher concentration (20 ppm). These results led to the conclusion that CLA could act as an antioxidant; however,

the authors point to the need of investigating long-term exposure to CLA. Catalase (EC 1.11.1.6, CAT), a tetrameric heme protein, is present in most aerobic cells, and is predominantly found in peroxisome, a cell organelle where oxidation of long-chain and very-long-chain fatty acids takes place. Peroxisome beta-oxidation results in the production of hydrogen peroxide (H_2O_2), a catalase substrate.

The above discussion of the results can be supported by the influence of CLA on the expression of transcription factors, such as peroxisome proliferator activated receptors (PPAR), particularly PPAR α and PPAR γ . Research works seeking to understand the action of CLA as activator or inhibitor of these nuclear receptors are somewhat conflicting, since both activation [34, 35] and inhibition [36, 37] are reported. Interpreting results of the present work on the assumption that CLA acts as a PPAR α ligand, as shown by Moya-Camarena et al. [34], does not seem consistent, since the increase of PPAR α expression would cause an increase in mitochondrial and peroxisome oxidation of fatty acids, and consequently an increase in H_2O_2 production, leading to increased catalase activity, and this was not observed in the present research. On the other hand, looking at the same results considering the findings of Kang et al. [36] and Grattagliari et al. [37], who demonstrated that CLA inhibits PPAR γ expression, it can be said that the results of the present work are consistent. This seems to be confirmed by the work of Gimeno et al. [38], which suggests that the increase in PPAR γ expression can increase catalase activity. Assuming that this relation is inversely proportional, a possible PPAR γ inhibition by CLA could lead to a decrease in catalase activity, as observed in the present research.

A further objective of this study was to assess the possibility of associating CLA administration to an antioxidant protection by means of a concomitant supplementation with α - α -tocopherol acetate. It is widely accepted that supplementation with antioxidants, particularly α -tocopherol, reduces oxidative stress [39], although there is some controversy. In recent years the scientific community has developed a new outlook about antioxidant supplementation, as a result of some evidence of adverse effects involving increased susceptibility to some diseases such as cancer and cardiovascular diseases. As a matter of fact, concerning cardiovascular diseases, the Dietary Guidelines of the American Heart Association say that there is no positive support for using antioxidant supplements in order to reduce the risk of cardiovascular diseases [40, 41].

There are practically no studies of CLA administered concomitantly with antioxidant protection, perhaps because there is a controversy surrounding its antioxidant properties [42, 43]. Results obtained in the present study showed that CLA supplementation concomitant with vitamin E did not

significantly reduce lipid oxidation ($P > 0.05$). The group receiving supplementation of CLA One®+ α - α -tocopherol acetate (group COE) did not display values different from the group receiving CLA mixture only (group CO) in any of the parameters under study. However, the group receiving AdvantEdge® CLA + α - α -tocopherol acetate (group AEE) had lower values ($P < 0.05$) for hepatic TBARS and urinary 8-iso-PGF₂, isoprostane. It is widely known in the scientific community that vitamin E is one of the most potent antioxidants; however, factors such as antioxidant dosage and bioavailability, and degree of exposure of the organism to oxidative stress must be taken into account. In a review by McCall and Frei [39], the real action of antioxidant compounds, including vitamin E, in the reduction of damage caused by oxidative stress was discussed. After considering the population, supplementation duration and dosage, lipid oxidation indicators and their determination methods, and the endpoints determined in the reviewed studies, the authors reported that vitamin E can protect the organism against lipid oxidation, but only in very high concentrations, far beyond the daily recommended values. The authors were led to conclude that further research is needed in order to clarify many doubts still surrounding the efficiency of antioxidant vitamin supplementation for oxidative stress prevention. From results of the present study, some hypotheses can be discussed in order to understand the low efficiency of vitamin E supplementation on most of the determined indicators, in addition to a possible inefficiency of antioxidant supplementation in some situations:

Supplement Dosage

The amount of α - α -tocopherol acetate used in this work was 30 mg/day, a relatively high amount compared to values recommended by AIN93G [17], namely, 75 mg/kg of diet. According to this recommendation, the daily consumption of vitamin E through diet for the rats in the present experiment would be in the range of 1.5–3 mg (taking into account the feed consumption variation during the experimental period: 20–40 g/day). It should be pointed out that the amount of α - α -tocopherol acetate used in the assay was chosen on the basis of previous works of this laboratory. In view of the above, it is plausible that the amount of supplement might have been excessive, preventing the detection of any difference that might exist among groups, since there is a debate about the inefficiency of even the adverse result of excessive supplementation. This hypothesis is based on the concept of the previously mentioned phenomenon of hormesis, which has already been documented for many compounds, including vitamin E [33].

Exposure to Oxidative Stress

It is important to point out that one of the objectives of the present research, based on the chemical structure of CLA, was to gather information to clarify the supposition that this supplement has a pro-oxidative effect. Thus, rats would be exposed to a pro-oxidative agent, and from this, protection of vitamin E against this agent would be assessed, since it can increase oxidative stability of unsaturated fatty acids with conjugated double bonds [44]. However, although the issue is still unresolved, there is a hypothesis that CLA acts as an antioxidant agent [42, 43], which would explain the results, as the rats would not have been so exposed to oxidative stress. Such a hypothesis would also lead some support to the conclusion that, if CLA really has an antioxidant effect, this effect is not enhanced by the presence of vitamin E.

Conclusions

After examining the results of IP, MDA and 8-iso-PGF₂, isoprostane, we conclude that the influence of conjugated linoleic acid on lipid oxidation, as measured by these indicators, depends on the CLA supplement type. Mean values expressing serum catalase were significantly lower in CLA supplemented groups, with or without vitamin E, than in the control group, suggesting antioxidant activity. The efficiency of vitamin E supplementation, particularly for the control group for the indicators catalase and 8-iso-PGF₂, isoprostane, should be highlighted. Thus, the results of lipid oxidation indicators are uncertain, but did warrant the conclusion that supplementation with conjugated linoleic acid influenced the process of biological lipid oxidation in different ways, and the influence is dependent on supplement type and the determination indicator used, including its tissue and determination method.

Acknowledgements To Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Process 00007986-4), to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Process 308742/2003-6) for the financial support, and to researcher BOTTELHO, A.P., respectively, and to Dr. Eliangela Paria of the Laboratory of Natural Products, Institute of Biology, São University of Campinas for technical assistance.

References

- Salas-Salvadó J, Miquel-Santolà F, Bulló M (2006) Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effects on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46:479–488
- Yamawaki M, Saito M, Miyachi M, Rosh JAG, Kramer JEG, Ku Y (1999) Variations in isomer distribution in commercially available conjugated linoleic acid. *Food Lipid* 101:277–282
- Paria MW, Ashoor SM, Cho RS, Lund DB (1979) Effects of temperature and time on mutagen formation in pre-fried hamburger. *Cancer Lett* 7:63
- Paria MW, Ilgenfuss WA (1987) A heat-derived mutagenic modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumours by 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene. *Carcinogenesis* 8:591
- Cannell JJ, Devery R, O'Brien M, Stanton C (1999) The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 34:327–329
- Itani S, Strobelman A, Vessby B (2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett* 468:33–36
- Yamawaki M, Muroh K, Miyachi M, Kimura G, Saito M, Kuai M, Tadokura H, Yamada K (2000) Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and biological change in rat liver tissues. *J Agr Food Chem* 48:6562–6571
- Rianna U, Vessby B, Arslan J, Sato S (2000) Effects of α -9, α -11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men. *Am J Clin Nutr* 70:278–283
- Parodi JW (1975) Conjugated octadecenoic acids of milk fat. *J Dairy Sci* 58:150–153
- Ostrowska E, Waller GP, Doyle PT, Dunbar PR (2000) Milk conjugated linoleic and trans-vaccenic acids are higher in Spring grazing cows. *Asia Pac J Clin Nutr* 13(suppl):353
- Bauman DE, Baumgard LH, Cori BA, Grinari BM (1999) Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc Am Soc Anim Sci* Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings0937.pdf>
- Cori BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Grinari BM, Phillips BS, Bauman DE (2000) The role of delta-9-desaturase in the production of α -9, α -11. *J Nutr Biochem* 12:622–630
- Park Y, Suckow RM, Nisbani JM, Cook ME, Shih CJ, Paria MW (1999) Evidence that the α -9, α -11 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:252–261
- Park BS, Cho HY, Ha YL, Park JHY (2004) Dietary conjugated linoleic acid increases the mRNA ratio of Bax/Bcl-2 in the colonic mucosa of rats. *J Nutr Biochem* 15:229–235
- Tanaka-Saito F, Liu J, Hendry LB, Stoll N (2004) Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. *J Nutr* 134:674–680
- Munday JS, Thompson RG, James KA (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty acid formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* 81:251–255
- Rovers PJ, Nelson PR, Polay GC (1998) AHA93: Profiled data for laboratory rodents. Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Working Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 128:1939–1951
- Gomes M, Mato E, Fernandes-Gomes L, Tour A, Pohlbeck G, Santolín S (1999) Effect of the raw lactone. *Food intake on muscle and liver protein metabolism in growing rats. Rev Esp Fisiol* 45:55–60 Supplement
- Christie WW (1982) A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *J Lipid Res* 23:1072–1074
- Saito M, Kramer JE, Miyachi M, Yamawaki M, Rosh JAG, Saito K, Muroh K, Ku Y (1999) Identification of conjugated linoleic acid isomers in tissue by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic retention sequences. *Lipids* 34:965–971
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917

25. Association Of Official Analytical Chemists, AOAC (1995) Official methods of analysis 16 ed. Cincin (Pa) Virginia: AOAC International v 1
26. Simmler RO, Yu TC (1958) 5-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fatty products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. Food Technol 12:9–12
27. Goh L (1994) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 196:143–152
28. SAS Institute. Project for Windows: User's Guide: statistics. Version 8.0. Cary, SAS Inst, 2003
29. Santos-Zago LP, Botelho AP, Reis SMPM, Oliveira AC (2005) Effect of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in vitro. Anais do 3 Simpósio em Ciência de Alimentos, Florianópolis v3
30. Pinto-Dye NL, Omaye ST (2005) Antioxidant effects of conjugated linoleic acid isomers in isolated human low-density lipoproteins. Nutr Res 25:1–12
31. Roberts LJ, Morrow JD (2000) Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med 28:505–513
32. Baou S, Radu U, Turpeinen A, Vealby B (2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. Clin Sci 99:511–516
33. Park Y, Skorkson JM, Albright EJ, Liu W, Pariza MW (1999) Evidence that the *cis-10, cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. Lipids 34:235–241
34. Radu U, Baou S, Avogaro P, Pedrinelli GN, Amadio J, Vealby B (2002) Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein—a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. Circulation 105:1925–1929
35. Smedman A, Vealby B, Baou S (2004) Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by a cyclooxygenase-2 inhibitor. Clin Sci 106:67–73
36. Calbrese EJ, Baldwin EA (1999) Chemical hormones: in historical foundations as a biological hypothesis. Toxicol Pathol 27: 85–216
37. Moya-Camarena SY, Havel BV, Blanchard SG, Lowmiller LA, Belury MA (1999) Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . J Lipid Res 40:1436–1437
38. Belury MA, Moya-Camarena SY, Lu M, Shi L, Lowmiller LM, Blanchard SG (2002) Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ). Nutr Res 22:817–824
39. Kang X, Liu W, Albright EJ, Park Y, Pariza MW (2000) *cis-10, cis-12* CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR γ expression. Biochem Biophys Res Commun 270:795–799
40. Grankerd L, Jovenet LE, Pedman J, Mabb BE (2003) *cis-10, cis-12* conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. J Lipid Res 44:1441–1452
41. Girman GD, Deman PE, Moore SA, Robbins MEC (2002) Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. Mol Endocrinol 16:2793–2801
42. McCall M, Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Radic Biol Med 26:1034–1053
43. Williams EJ, Fisher EA (2005) Oxidation, lipoproteins and atherosclerosis: which is wrong, the antioxidants or the theory? Curr Opin Clin Nutr 8:139–146
44. Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV (2004) Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. Circulation 110:637–641
45. Ha YL, Girman ME, Pariza MW (1985) Antioxidants from fried ground beef: benzofuran derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis 6:1881–1887
46. Ha YL, Skorkson J, Pariza M (1990) Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated linoleic acid. Cancer Res 50:1097–1101
47. Tawakoli T, Igarashi M, Iwata T, Yamashita-Sato Y, Yamamoto T, Ogita K, Suzuki T, Miyajima T (2004) Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linoleic acid is altered by triacylglycerol acylation and α -tocopherol. Lipids 39:475–480

Contact us 
Help ?

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Revisions Being Processed for Author Lilia Ferreira Santos-Zago, M

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed)

Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
View Revision R1 Send E-mail	NUT-D-07- 00153	Conjugated Linoleic Acid, Lipid Accumulation and Hepatic Morphology Alteration in Healthy Wistar Rats	Jul 06, 2007	Jul 21, 2007	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total revisions
being processed)

Display results per page.

Revista de Nutrição (protocolo 1384)

Página 1 de 2

De: "Revistas CCV" <revistas.ccv@puc-campinas.edu.br>
Assunto: Revista de Nutrição (protocolo 1384)
Data: Sex, Maio 11, 2007 3:04 pm
Para: lzago@fea.unicamp.br

Campinas, 11 de maio de 2007

OFÍCIO/NE/RN nº 580/2007

Ilustríssima Senhora Profa. Lília Zago

Venho pelo presente agradecer o envio do manuscrito Suplementação com ácido linolêico conjugado: estabilidade... para publicação na Revista de Nutrição. Para toda a correspondência futura relativa a este trabalho, por favor, refira-se ao protocolo número 1384.

O Conselho Editorial procederá a tramitação regular do processo de aprovação do manuscrito, entendendo que o mesmo não foi publicado anteriormente e que não será submetido a outro periódico durante o período de revisão.

Tão logo quanto possível, V.Sa será notificado(a) a respeito do processo para consideração de eventuais sugestões dos revisores ou sobre a aprovação do trabalho.

Informamos que a partir da submissão do manuscrito aos revisores técnicos, serão aceitas somente duas novas versões a partir do original.

Novamente grata por seu interesse na Revista de Nutrição, expresso nossas saudações.

Atenciosamente

Maria Cristina Matoso

Revista de Nutrição

Editora Gerente

Atenciosamente

Elizabeth S. Lima

Auxiliar de Biblioteca

Núcleo de Editoração SBI/CCV

Centro de Ciências da Vida

SCEI - Sociedade Campineira de Educação e Instrução
Mantenedora da PUC-Campinas e do HMCP

revistas.ccv@puc-campinas.edu.br - <http://www.puc-campinas.edu.br/centros/ccv>
Telefone: (19) 3729-6876/6859 - Telefone Fax: (19) 3729-6875

Attachments:

untitled-[1.2]	
Size:	4.9 k
Type:	text/html