



CIBELE PRISCILA BUSCH FURLAN

**O EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) E
DOS FITOSTERÓIS NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE
INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA UTILIZANDO
MODELO EXPERIMENTAL**

**THE EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA)
AND PHYTOSTEROLS IN PREVENTING FAT DIET-
INDUCED OBESITY USING EXPERIMENTAL MODEL**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CIBELE PRISCILA BUSCH FURLAN

**O EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) E DOS FITOSTERÓIS NA
PREVENÇÃO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA UTILIZANDO
MODELO EXPERIMENTAL**

**THE EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) AND PHYTOSTEROLS IN
PREVENTING FAT DIET-INDUCED OBESITY USING EXPERIMENTAL MODEL**

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Alimentos e Nutrição, na área de concentração em Nutrição Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Dissertation submitted to the Graduate Program in Food and Nutrition the Faculty of Food Engineering of State University of Campinas for obtaining a Master's Degree in Food and Nutrition, in the area of concentration in Experimental Nutrition Applied to Food Technology.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CIBELE PRISCILA BUSCH
FURLAN E ORIENTADA PELO PROF. DR. MÁRIO
ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

F978e Furlan, Cibele Priscila Busch, 1985-
O efeito do ácido linoléico conjugado (CLA) e dos fitosteróis na prevenção da obesidade induzida por dieta hiperlipídica utilizando modelo experimental / Cibele Priscila Busch Furlan -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Obesidade. 2. Acido linoleico conjugado. 3. Fitosteróis. 4. Suplementação. 5. Dieta hiperlipídica. I. Maróstica Júnior, Mário Roberto, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: : The effect of conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterols in preventing fat diet-induced obesity using experimental model

Palavras-chave em inglês:

Obesity

CLA (Conjugated Linoleic Acid)

Phytosterol

Supplementation

High-fat diet

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

Titulação: Mestra em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Mário Roberto Maróstica Júnior [Orientador]

Renato Grimaldi

Semiramis Martins Alvares Domene

Gabriela Macedo

Danielle Caranti

Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Banca Examinadora

Prof. Dr. Mário Raberto Maróstica Júnior

Orientador

Prof. Dr. Renato Grimaldi

Titular

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profª Drª Semiramis Martins Alvares Domene

Titular

Universidade Federal da São Paulo - UNIFESP

Profª Drª Gabriela Alves Macedo

Suplente

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Profª Drª Danielle Arisa Caranti

Suplente

Universidade Federal da São Paulo - UNIFESP

Dedico esse trabalho aos meus pais, *Sebastião Cezar Furlan e Monica Cristina Busch Furlan*, pelo amor incondicional, carinho e compreensão, e ao meu professor, *Plínio Marcos Tsai*, pela compreensão, altruísmo e dedicação durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior pela orientação e oportunidade de trabalharmos juntos.

À Dra. Soely Maria Pissini Machado Reis, pela grande amizade e ajuda constante, fundamentais durante esses anos de pesquisa.

À Banca Examinadora pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento do trabalho.

À Prof. Dr. Semirames Domene, que me inspirou a entrar na área acadêmica, pelo brilhantismo com que atua na área de nutrição. Agradeço pela ilustre presença na banca.

Ao Prof. Dr. Renato Grimaldi e à técnica Priscila Alessandra da Silva do Laboratório de Óleos e Gordura pela parceria e orientação nas análises cromatográficas dos suplementos.

À Prof. Dr. Danielle Caranti pela amizade inesperada em pouco tempo, pela gentileza constante e pelas sugestões que enriqueceram o trabalho.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada e à técnica Stephanie Souto Maior Federighi do Instituto de Biologia pela parceria, orientação e ajuda nas análises histológicas.

Ao Prof Dr. Fabio Augusto e à Dr^a. Soraia Neves pela parceria e colaboração com as análises cromatográficas de lipídios do sangue.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio-Pesquisa concedido (Processo nº2010/05262-5).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À *Cognis Brasil Ltda* pelo fornecimento dos suplementos utilizados no experimento.

À Faculdade de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica de Campinas pelos anos de aprendizagem e inspiração.

À Maria Susana Corrêa Alves da Cunha, pelo apoio técnico e descontração durante a execução do ensaio biológico.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, em especial Cidinha, Fátima e Francisco, pela ajuda durante todo o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo, Anne, Angela, Cinthia, Gláucia, Juliana, Rafaela, Sabrina, Gabriela e Érica por todos os momentos especiais

compartilhados. Sem vocês meninas meu trabalho no laboratório não teria sido divertido e agradável, como foi.

Ao meus irmãos, Estevan Furlan, Victor Furlan e Lucas Furlan pelos momentos de ajuda, apoio, descontração e risadas.

Aos amigos Tattiane Marques, Nirvana França, Loyane Ferreira, Estela Piccin, Ethel Beluzzi, Patrícia Palazzo, Fernando Van Pia e Viviane Bosso pela companhia, ajuda constante e amizade, que durante estes anos foram fundamentais.

Aos meus amigos e professores de inglês Jonathan Lobsang Chogni, Ethel Panitsa Beluzzi e Ana Mazza pela dedicação e ajuda com os diversos trabalhos.

À Larissa Bajay e Camilla Bertuzzo Veiga pela ajuda e amizade durante todo o ensaio biológico e durante as análises.

Sumário

Resumo.....	iv
Abstract	vi
Introdução geral	1
Referências.....	3
Objetivos	4
Objetivos gerais.....	4
Objetivos específicos	4
CAPITULO 1: Revisão de literatura.....	5
1 CLA.....	6
1.1 Caracterização química	6
1.2 Efeitos fisiológicos e mecanismos.....	8
2 Fitosteróis.....	11
2.1 Caracterização das moléculas.....	11
2.2 Efeitos fisiológicos	12
2.3 Mecanismo de ação dos fitosteróis.....	12
2.4 Ação anti inflamatória e antioxidante.....	16
Referências.....	17
CAPÍTULO 2: Conjugated linoleic acid and phytosterols counteract obesity induced by high-fat diet.....	21
Abbreviations	22
Abstract	22
1. Introduction.....	23
2. Materials and methods	24
2.1 Experimental animals and procedures.....	24
2.1.1 Animals and experimental design.....	24
2.2 Diets and supplements.....	24

2.3 Monitoring of food intake and weight gain of animals	26
2.4 Determination of the hormone levels	26
2.5 Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)	27
2.6 Statistical analysis	27
3. Results	27
3.1 Hormones and adipose tissue	27
3.2 GTT and ITT	30
3.3 Feed consumption and body weight loss	31
4. Discussion	33
5. Conclusion.....	37
Acknowledgements	37
References	37
CAPÍTULO 3: Redução de gotas de gordura no fígado de ratos suplementados com CLA e ou fitosterol	43
Resumo.....	44
1. Introdução	44
2. Materiais e métodos	45
2.1 Animais experimentais e procedimentos	45
2.2 Animais: características e desenho experimental	45
2.3 Dietas e suplementos	46
2.4 Enzimas do estresse oxidativo e marcadores de oxidação lipídica	46
2.5 Análise microscópica do tecido hepático	47
2.6 Análise cromatográfica do soro dos animais.....	47
2.7 Análise estatística	48
3. Resultados	48
3.1 Perfil do estresse oxidativo.....	48
3.2 Perfil hepático.....	51
3.3 Ácidos graxos presentes no sangue	54

4. Discussão.....	56
Referências.....	60
CAPITULO 4: CLA e/ou fitosterol, adicionados à dieta hieprlipídica, alteram composição centesimal da carcaça de ratos <i>Sprague-Dawley</i>	
Resumo.....	64
Abstract	65
1. Introdução	66
2. Objetivo.....	67
3. Material e métodos.....	67
3.1 Ensaio Biológico	68
3.1.1 Os animais	68
3.1.2 Desenho Experimental e Dietas.....	68
3.1.3 Procedimento de preparo da carcaça dos animais experimentais	69
3.1.4 Determinações da carcaça dos animais experimentais	70
3.1.5 Análise Estatística.....	70
4. Resultados	70
5. Discussão.....	70
6. Conclusão.....	72
Referências.....	73
Conclusão geral.....	76
Anexos.....	77
Anexo 1	77
Anexo 2	78
Anexo 3	79

Resumo

Obesidade se tornou o maior problema de saúde pública ao redor no mundo e é associado, geralmente, com doenças crônicas não transmissíveis como a diabetes. Alguns componentes dos alimentos estão relacionados com benefícios à saúde como modulação do estresse oxidativo, hormônios e inflamação. O ácido linoléico conjugado (CLA) é um ácido graxo que pode exercer papel antioxidante, possivelmente pela influencia na auto oxidação lipídica. Outros lipídios, esteroidais das plantas, os fitosteróis são considerados também compostos bioativos, uma vez que eles são responsáveis pela redução da circulação do LDL colesterol, bem como pela redução do peso corporal. Em adição, esses compostos são anti-inflamatórios, e apresentam importante potencial para prevenir efeitos adversos da obesidade. Nessas condições, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da suplementação do CLA e fitosterol, sozinhos e em combinação, em relação aos hormônios da saciedade, glicose, resistência a insulina, perda de peso, consumo e os efeitos no fígado e sua influencia no sistema antioxidante de defesa em ratos machos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hiperlipídica. Quarenta ratos *Sprague-Dawley* recém-desmamados foram divididos em cinco grupos (n=8) aleatoriamente: grupo Padrão, grupo Hiperlipídico Padrão, e três grupos hiperlipídicos com adição de 2% de CLA, 2% de fitosterol e 2% de CLA mais 2% de fitosterol. Todas as dietas tiveram como base a AIN-93G, sendo as dietas experimentais *high-fat* adicionadas de 35% de banha animal e 2% de cada suplemento. O tempo de experimento foi de 65 dias. O grau de sensibilidade à insulina foi calculado nas últimas semanas experimentais, por meio dos métodos Teste de Tolerância à Glicose e Teste de Tolerância à Insulina. O acompanhamento do ganho de peso e consumo foi feito por pesagem. As análises das enzimas do estresse oxidativo, 8-F₂-Isoprostana e hormônios foram determinadas utilizando kits comerciais, apenas as análises de malondialdeído foram feitas pelo método de TBARS. A dieta suplementada com CLA, fitosterol ou a combinação de ambos, por 65 dias foi efetiva na redução da massa gorda, dos tecidos adiposos e do consumo alimentar. Ademais, CLA mas não o fitosterol modulou a ação da leptina na obesidade. No entanto, os suplementos apresentaram efeito na modulação das enzimas do estresse oxidativo indicando possível dano mitocondrial e citotoxicidade, além de não reverterem o processo de intolerância a glicose e resistência a insulina. Por outro lado, os suplementos reduziram as gotas de gordura no fígados dos animais suplementados.

Palavras-chave: obesidade, ácido linoléico conjugado, fitosterol, suplementação, dieta high-fat.

Abstract

Obesity is one of the most serious public health problems worldwide and is generally associated with chronic diseases such as diabetes. Some food compounds are linked to benefits in health as they modulate oxidative stress, hormones and inflammation. Conjugated linoleic acid (CLA) is a fatty acid that could exert an antioxidant role, possibly by its influence on lipid auto-oxidation. Other lipids, steroidal plant, the phytosterols are considered also bioactive compounds, since they are responsible for the reduction of LDL cholesterol circulation, as well as reduction in body weight. In addition, these compounds are considered to play anti-inflammatory roles, and they are potentially important in preventing the adverse effects of obesity. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of CLA and phytosterol supplementation, alone or in combination, in relation to satiety hormones, glucose and insulin resistance, weight loss and adipose tissue, and feed consumption and liver effects and their influence in the modulation of antioxidant system on male *Sprague-Dawley* rats fed a high-fat diet. Forty rats of the *Sprague-Dawley* specie, males and healthy were divided into five groups (n=8) randomly: standad group, *High-Fat*standad group, and three groups that received the standard experimental *high-fat* diet with addition of 2% CLA, with addition of 2% phytosterol and with addition of 2% CLA plus 2% phytosterols. All diets were based on the AIN- 93G, and experimental diet high-fat add of 35% lipids, and 2% each supplement. The period of experiment was 65 days. The insulin sensitivity was calculated in the last week experimental by the methods Tolerance Test Glucose and Insulin Tolerance Test. The monitoring of consumption and weight gain was made by weighing. The analysis of the enzymes of oxidative stress, 8-F₂-isoprostane and hormones were determined using commercial kits, only the analyzes of malondialdehyde were made by the method of TBARS. The diet supplementations with CLA, phytosterols or their combination, for 65 days were effective in reducing body fat, adipose tissue and feed consumption. Furthermore, CLA, but not phytosterols, modulated the action of leptin in obesity. However, the supplementation had an effect in modulating the enzymes of oxidative stress indicating possible damage and cytotoxicity mitocontrial, moreover both supplements did not reverse the process of glucose intolerance and insulin. On the other hand, the supplementation reduced the liver fat droplets of the animals.

Key-words: obesity, conjugate linoleic acid, phytosterol, supplementation, high-fat die.

Introdução geral

Devido ao aumento da obesidade atribuído não somente ao sedentarismo, mas também à maior disponibilidade e consumo de alimentos de alta densidade energética (MANGOU et al., 2012), muitos estudos têm realizado, em modelos animais, a indução à obesidade por meio da manipulação dietética, de forma a alimentá-los com dieta ‘high fat’ desde o desmame. O desenvolvimento do processo oxidativo e das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a obesidade, favorecem o desdobramento de tais pesquisas a fim de produzir conhecimento técnico-científico para produção de estratégias que garantam qualidade de vida (HORACEK et al., 2010; CHEN; QIAN, 2012).

O processo oxidativo, desencadeado pela inflamação subclínica induzida pela obesidade, vem sendo cada vez mais estudado por meio dos métodos de análise laboratoriais com o objetivo de aprofundar no que se refere ao sistema de antioxidação fisiológico e as diversas espécies reativas de oxigênio, observado em tecidos hepáticos, sanguíneos e renais, para que haja possibilidade de benefícios, por meio da suplementação de antioxidantes para a prevenção das DCNT (HOPP et al., 2010).

Algumas das pesquisas já realizadas com ácido linoléico conjugado (CLA) determinaram seu poder de alterar a composição corporal, propiciando um aumento da massa magra e diminuição da massa gorda, de modo a agir ainda sobre a lipogênese, e também sobre a influência no processo de autoxidação lipídica podendo funcionar, portanto, como um antioxidante. A suplementação desse lipídio ainda é questionada e pesquisada devido aos possíveis efeitos colaterais como a resistência à insulina ou ação hiperinsulinêmica dependendo da concentração suplementada, além ainda dos questionamentos científicos que apresentam resultados conflitantes quanto à sua ação biológica (MARQUES et al., 2012; MARINELI et al., 2012).

Compostos esteroidais das plantas, os fitosteróis, são estruturas químicas similares ao colesterol, sendo considerados como compostos funcionais, pois são responsáveis pela redução do LDL colesterol e do colesterol circulante devido à diminuição da absorção do colesterol exógeno e do colesterol biliar (THURNHAM, 2007; WOYENGO, RAMPRASATH, JONES, 2009). Em adição, esses compostos são considerados ainda como antioxidantes e anti-inflamatórios, por impedirem a formação de

IL-6 e TNF- α , sendo possivelmente importantes na prevenção dos efeitos adversos da obesidade (BI et al., 2009; MICALLEF; GARG, 2009).

Nesse sentido, o escopo do presente trabalho é investigar a ação do CLA e dos fitosteróis sobre os mecanismos fisiológicos e moleculares, na prevenção da obesidade em ratos machos e saudáveis da espécie *Sprague-Dawley*.

Referências

MANGOU, A. et al. Associations between diet quality, health status and diabetic complications in patients with type 2 diabetes and comorbid obesity. **Endocrinología y Nutrición**, v. 59, n. 2, p. 109-116, 2012. ISSN 1575-0922. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157509221100355X> >.

HORACEK, T. M. et al. Participatory Research with College Students Identifies Quality of Life and Stress as Key Issues for Obesity Prevention. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 9, Supplement, p. A28, 2010. ISSN 0002-8223. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002822310008035> >.

CHEN, Y.; QIAN, L. Association between lifetime stress and obesity in Canadians. **Preventive Medicine**, v. 55, n. 5, p. 464-467, 2012. ISSN 0091-7435. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091743512003866> >.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 2010. ISSN 0939-4753. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475309001409> >.

MARQUES, A. Y. C.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Redução do peso e da glicemia resultante da suplementação de ácido linoleico conjugado e fitosteróis à dieta hiperlipídica de camundongos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 374-380, 2012. ISSN 0103-8478. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000200029&nrm=iso >.

MARINELI, R. D. S. et al. Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 487-493, 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002657> >.

BI, Y. et al. Increased carnitine palmitoyl transferase 1 expression and decreased sterol regulatory element–binding protein 1c expression are associated with reduced intramuscular triglyceride accumulation after insulin therapy in high-fat–diet and streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism**, v. 58, n. 6, p. 779-786, 2009. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049509000481> >.

MICALLEF, M. A.; GARG, M. L. Anti-inflammatory and cardioprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and plant sterols in hyperlipidemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 2, p. 476-482, 2009. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002191500800676X> >.

THURNHAM, D. I. Functional foods: cholesterol-lowering benefits of plant sterols. **British Journal of Nutrition**, v. 82, n. 04, p. 255-256, 1999. ISSN 0007-1145. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114599001440> >. Acesso em: 1999.

WOYENGO T.A; RAMPRASATH V.R; JONES P.J.H. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p.813-820,2009.ISSN 0954-3007. Disponível em: < <http://www.nature.com/ejcn/journal/v63/n7/full/ejcn200929a.html>>.

Objetivos

Objetivos gerais

Avaliar o efeito do ácido linoléico conjugado (CLA) e dos fitosteróis sobre o tecido adiposo, perfil lipídico, ganho de peso, resistência à insulina, oxidação lipídica em ratos machos da espécie *Sprague-Dawley* alimentados com dieta experimental hiperlipídica.

Objetivos específicos

- Determinar a composição em ácidos graxos (CLA e ácido linoléico) e em fitosteróis dos suplementos e das dietas experimentais;
- Avaliar e monitorar a ingestão dietética e ganho de peso dos animais;
- Determinar o perfil lipídico (ácidos graxos livres) e hormonal (insulina, adiponectina, leptina e grelina séricas);
- Determinar o grau de resistência à insulina pelo Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e pelo Teste de Tolerância à Insulina (ITT);
- Determinar as concentrações séricas/plásmaticas dos produtos da oxidação lipídica malondialdeído, 8-iso-PGF₂α-isoprostana e glutationa total e de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e superóxido dismutase);
- Quantificar os marcadores de oxidação lipídica índice de peróxidos e malondialdeído, no fígado.
- Determinar presença de glóbulos de gordura presentes no tecido hepático dos grupos suplementados em comparação com o padrão.

CAPÍTULO 1:

REVISÃO DE LITERATURA

1 CLA

1.1 Caracterização química

Ácido linoléico conjugado (CLA) é um ácido graxo encontrado no leite e em carne de ruminantes. Os isômeros, que apresentaram atividade biológica são CLA *trans*-10,*cis*-12 (*t*-10,*c*-12) e CLA *cis*-9,*trans*-11 (*c*-9, *t*-11) (figura 1) (GIANCAMILLO et al., 2009). O isômero *c*-9,*t*-11 representa aproximadamente 80% das gorduras produzidas pelos ruminantes, por outro lado o CLA *c*-9,*t*-11 e o *t*-10,*c*-12 são igualmente abundantes nas misturas comerciais, sendo aproximadamente 30-40% de cada isômero (ANDREOLI et al., 2009).

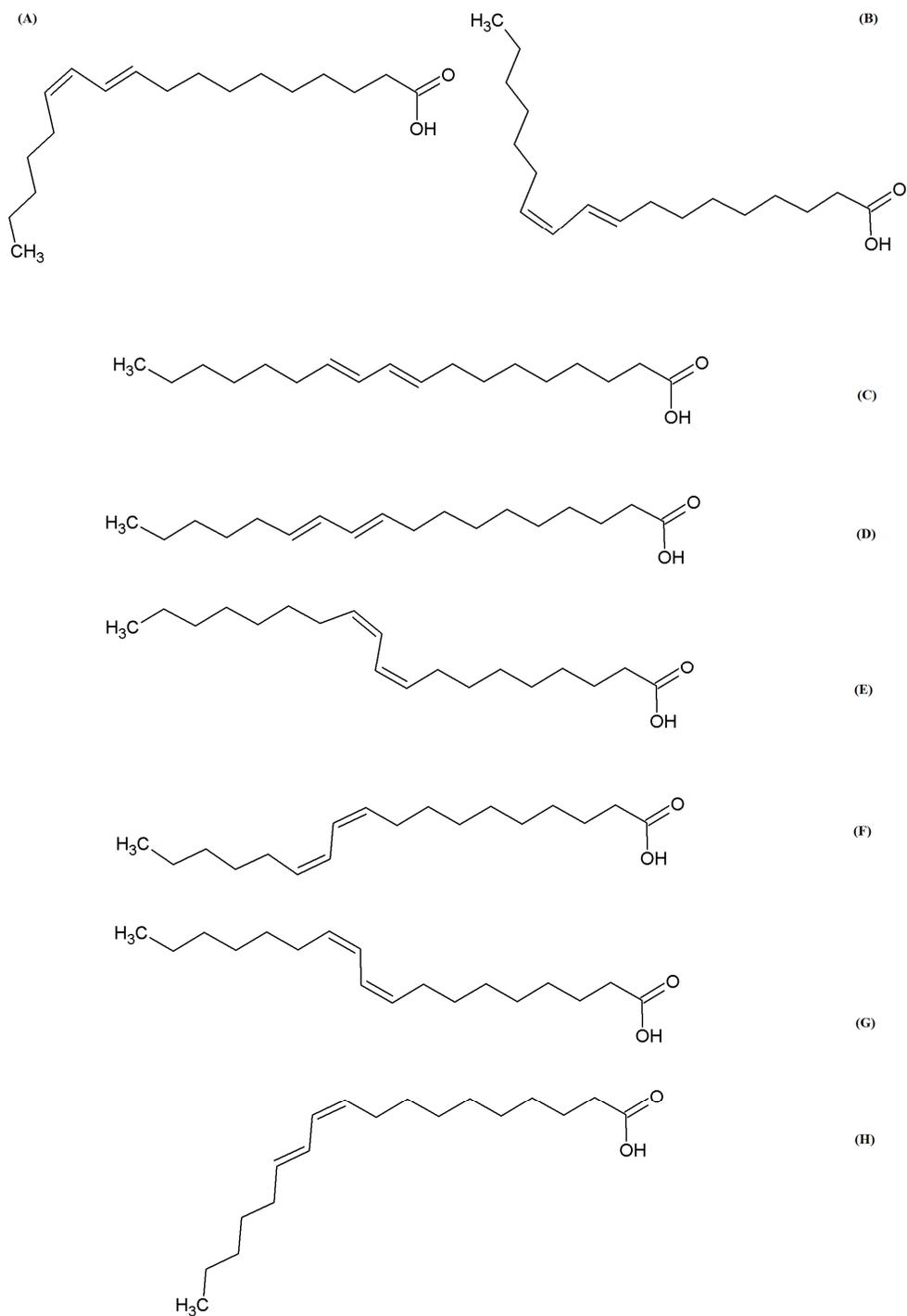


Figura 1. Posição geométrica e isomérica do CLA. (A) CLA *t*-9, *c*-12. (B) CLA *t*-9, *c*-11. (C) CLA *t*-9, *t*-11. (D) CLA *t*-10, *t*-12. (E) CLA *c*-9, *c*-11. (F) CLA *c*-10, *c*-12. (G) CLA *c*-9, *t*-11 (H) CLA *c*-10, *t*-12 (adaptado FRITSCHÉ et al., 1999).

A formação do CLA é resultante da ação de bactérias anaeróbicas *Butyrivibrio fibrisolvens* no rumem ácido, que transforma os ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoléico, α -linolênico e γ -linolênico) por meio do processo de biohidrogenação. Além dessa etapa, a formação dessa gordura pode ocorrer também pela autoxidação do ácido linoléico, na presença de proteína, enzima isomerase e oxigênio singlet, resultando na formação do ácido linoléico conjugado como apresentado na figura seguinte (FRITSCHÉ et al., 1999).

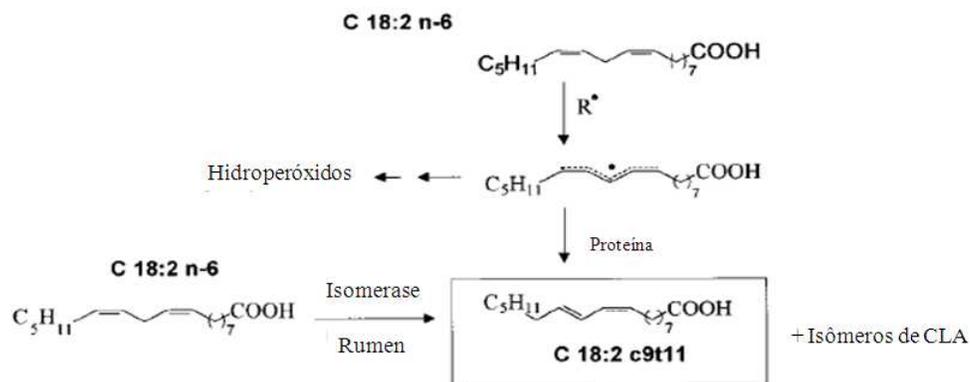


Figura 2. Produção de CLA por diferentes vias (FRITSCHÉ et al., 1999).

1.2 Efeitos fisiológicos e mecanismos.

Os isômeros do CLA são potentes moduladores Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomos (PPARs) em modelos animais suplementados (O'SHEA, BASSAGANYA-RIERA, MOHEDE, 2004), sendo a razão pela qual é apresentado como responsável pelos efeitos na redução da carcinogênese, diminuição da massa gorda, protetor do estresse oxidativo, modulador dos lipídios circulantes e responsável pelo efeito preventivo da intolerância a glicose na diabetes. No entanto, a maioria desses efeitos são ainda controversos na literatura (RAHMAN et al., 2011).

Quanto ao efeito de reduzir a carcinogênese e influenciar no processo inflamatório, o CLA *c-9,t-11* age na ativação do PPAR- γ . Presente nos macrófagos e células T, os PPAR- γ podem ser antagonistas da ativação da sinalização pró-inflamatória bem como do NF κ B e na expressão do interferon- γ (BASSAGANYA-RIERA et al., 2004; SUGII; EVANS, 2011).

O mecanismo de ação do CLA na redução do tecido adiposo não está claro, porque há discrepância entre resultados em estudos *in vivo e in vitro*, relatados com mecanismos e possibilidades de ação do CLA diferentes, além dos estudos não apresentarem um modelo animal padrão (GIANCAMILLO et al., 2009).

No entanto, um possível mecanismo que explique a ação do CLA na redução da massa gorda é por meio do integrante de resposta ao estresse (ISR) que induz a ativação da proteína transcritora fator 3 (ATF3) e ATF4, assim como ativa possivelmente o NFκB e a resposta inflamatória. A ocorrência do desdobramento da resposta proteica (UPR), com inclusão da ISR e inflamação é uma explicação para o desdobramento das doenças crônicas metabólicas bem como da diabetes tipo 2. O isômero CLA *t-10,c-12* ativa seletivamente apenas o componente ISR do sistema da UPR, sendo uma possível resposta à redução da massa gorda do tecido adiposo. A transcrição ou ativação da proteína é a chave para o fator de transcrição de adiposidade - como os esteróis com o envolvimento da SREBP1c ou acetil-CA carboxilase (ACC) e síntese de ácidos graxos - quando exposto ao CLA *t-10,c-12* (HOUSE et al., 2005; LAROSA et al. 2007).

Além disso, o mecanismo de ativação da AMPK é ainda uma forma de tratamento para resistência a insulina e diabetes tipo 2, desse modo, uma vez ativado, o AMPK vai agir indiretamente e parcialmente na percepção de energia do organismo e isso está associado com a regulação de adipocinas como de leptina e adiponectina. O CLA *t-10,c-12* atua no mecanismo da ativação da AMPK, sendo portanto, mais uma forma de explicar sua ação na redução da massa adiposa (JIANG et al., 2009).

A ingestão de CLA pode agir ainda na ação do PPARα segundo estudo de Peters et al. (2001), que apresentou a hipótese que o PPARα está envolvido fundamentalmente na oxidação de lipídios, e que o PPARβ e o PPARγ, estão envolvidos no aumento da expressão do RNAm que codifica o metabolismo enzimático dos lipídios e que esse sistema contribui para o efeito do CLA na redução de massa gorda e lipídios séricos.

Por outro lado, a indução do CLA *t-10, c-12* na alteração do metabolismo de ácidos graxos bem como do estado de lipodistrofia, é acompanhado de esteatose hepática e hepatomegalia como provável efeito compensatório do metabolismo de lipídios pela redução do tecido adiposo branco. De acordo com o estudo de Kennedy et al. (2010) há a

hipótese de que o CLA promova o aumento da citocina pró inflamatória NFκB, que gera o aumento da TNFα, IL-6 e IL-8, resultando na hiperinsulinemia e resistência a insulina, que no estado pró diabético é agravado pela baixa regulação da expressão de adiponectina e leptina nos tecidos adiposos, que são mediadores chaves na sensibilidade a insulina. Concomitantemente a esse processo, o fluxo de macrófagos desencadeia apoptose nos tecidos adiposos, que se acumulam no fígado, porém com incrível redução da oxidação lipídica nos músculos esqueléticos (figura 3). No fígado, ocorre a redução da expressão do PPARα pelo CLA, que resulta no aumento do NFκB, que é responsável pela lipogênese por meio da ativação da SREBP-1 no fígado, além da função de redução da β-oxidação, todo processo tem como consequência a hepatomegalia com esteatose hepática.

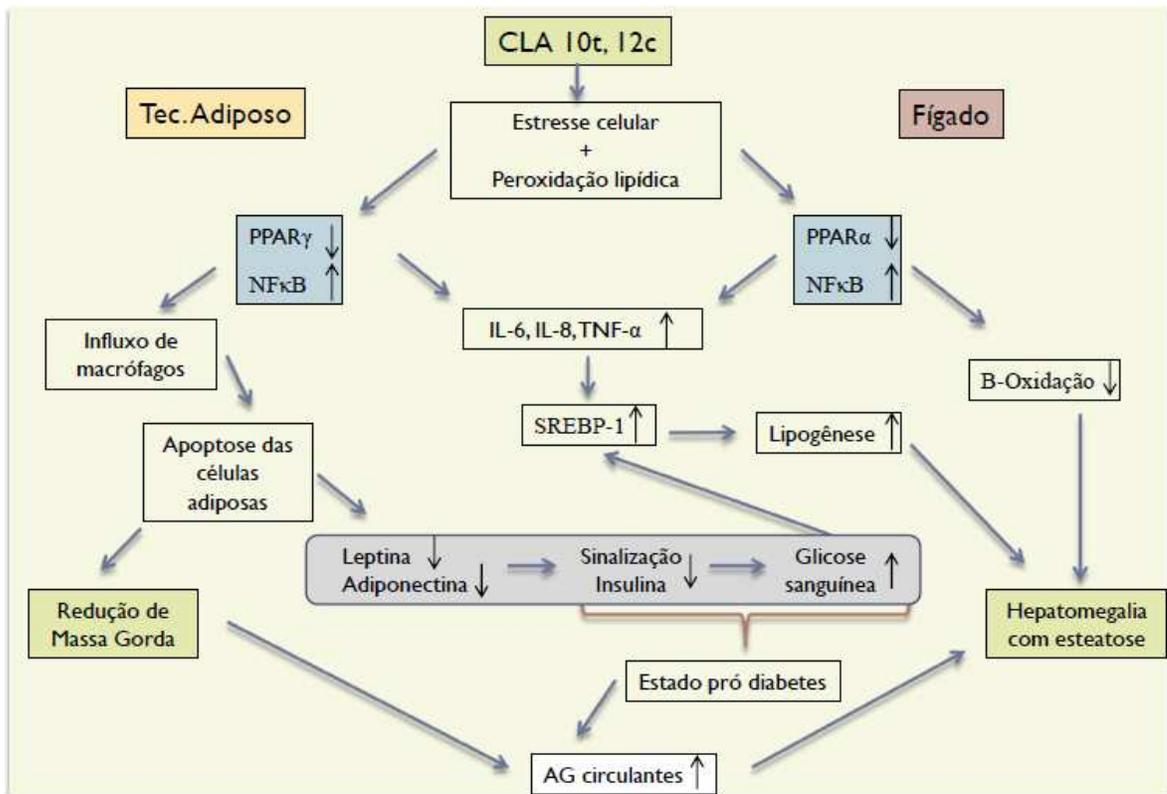


Figura 3. Mecanismo do CLA t-10, c-12 na alteração da lipodistrofia e citocinas inflamatórias (KENNEDY et al., 2010).

Por outro lado, é apresentado na literatura que o CLA é um potente ativador de PPARα quando regula o metabolismo de lipídio pela via da β-oxidação, gerando efeitos

benéficos na obesidade, diabetes não dependente de insulina e aterosclerose (MOYA-CAMARENA et al., 1999).

2 Fitosteróis

2.1 Caracterização das moléculas

Os esteróis são componentes alcoólicos presentes nas plantas conhecidos como fitoesteróis. Na forma saturada, os esteróis, recebem o nome de estanois sendo o mais comum o sitostanol (QUILEZ et al, 2003).

Assim como os demais lipídios, os esteróis também regulam processos e sustentam a estrutura celular das membranas, considerados reforçadores. Assim como o colesterol é o maior esterol dos vertebrados, o sitosterol, seguido do campesterol (Figura 4) são os esteróis mais abundantes dos vegetais (WEINGÄRTENER, et al., 2011; DUFOURC, 2008; OSTLUND, 2002). Os fitosteróis diferem minimamente quanto à estrutura química do colesterol, apresentando assim, função análoga nos animais (OSTLUND, 2002).

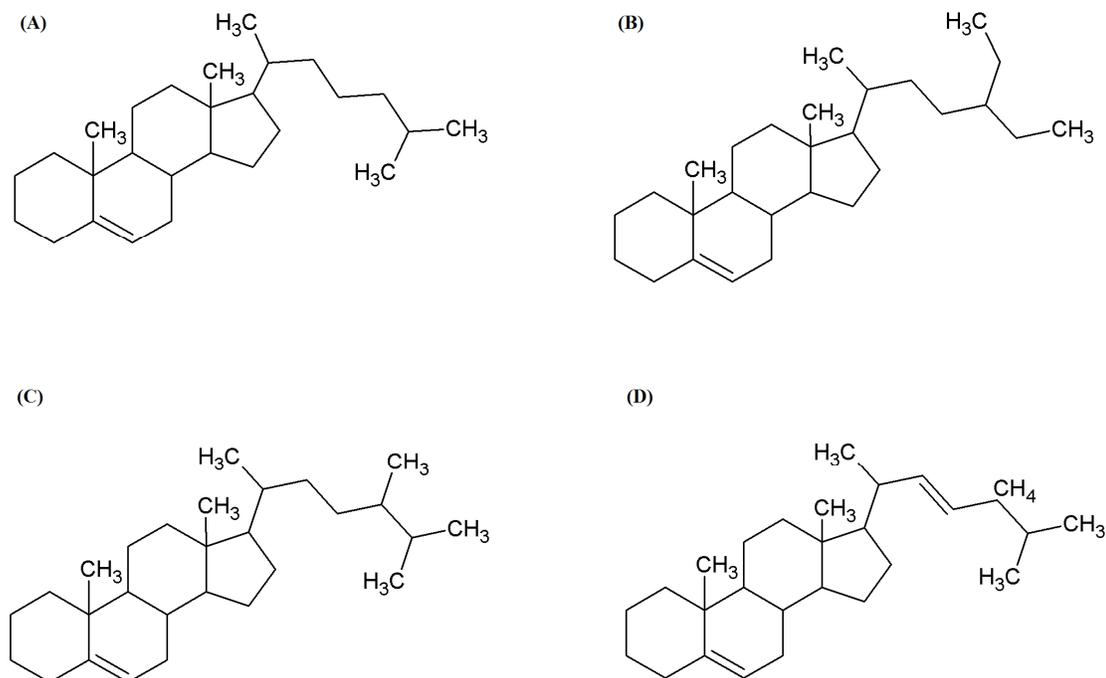


Figura 4. Estrutura química do colesterol e dos esteróis das plantas. (A) Colesterol. (B) Sitosterol. (C) Campesterol. (D) Stigmasterol (Adaptado CHEN, 2001).

2.2 Efeitos fisiológicos

O consumo regular de fitosteróis está relacionado à redução da absorção intestinal de colesterol, à redução dos níveis de LDL-colesterol e ainda à diminuição dos riscos para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (WOYENGO, RAMPRASATH, JONES, 2009).

No estudo de Theuwissen et al. (2009) a suplementação dietética de indivíduos hipertriglicéridêmicos com 2,5g de fitosterol /dia apresentou uma redução do colesterol total, LDL-colesterol e apolipoproteína B de 6,7%, 9,5% e 7,1% respectivamente, sem alterar o HDL-colesterol. Além disso, foi encontrada correlação significativa entre fitosterol e triglicérides, com redução desse de 11%. No estudo de Weingärtener, Böhm, Laufs (2011) ratos suplementados com 3,4% de fitosterol resultou na redução de 43% do colesterol plasmático e 46% do colesterol hepático.

No entanto, outros papéis biológicos para os esteroides das plantas estão documentados na literatura. Estão surgindo evidências das quais os fitosteróis podem atuar no aumento da atividade das enzimas antioxidantes e redução do estresse oxidativo, além de potencializar o processo antiinflamatório (WOYENGO, RAMPRASATH, JONES, 2009).

As diferentes estruturas lipídicas encontradas no estudo de Weingartner et al. (2011) sugerem, que os diferentes tipos de fitosteróis podem apresentar respostas metabólicas diferentes. Ao suplementar animais com esteróis e estanois das plantas observou-se que houve efeito diferente nos monócitos, linfócitos, no estresse oxidativo, nas citocinas inflamatórias, além da aterogênese. No entanto, tanto esteróis quanto estanois das plantas resultaram na redução da concentração do colesterol sérico. Os animais suplementados com esteróis apresentaram uma produção maior de monócitos pró-inflamatórios e consequente redução da lesão aterosclerótica, além disso, houve ainda redução de superóxido vascular e da produção de hidroperóxidos lipídicos.

2.3 Mecanismo de ação dos fitosteróis.

A dieta humana contém alimentos fonte de esteroides de origem animal e de vegetal, como o colesterol e o fitosterol (sitosterol), respectivamente. A rota pela qual os esteróis entram no enterócito ainda é discutida. Acredita-se, que pode ser por difusão

passiva, por meio da formação de micela ou ainda pela proteína Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (ALLAYEE, LAFFITTE, LUIS, 2000; WEINGARTNER et al, 2011).

Evidências científicas apontam que o fitosterol afeta a absorção do colesterol no lumen intestinal, pois suas estruturas químicas são semelhantes, alterando apenas a cadeia lateral (figura 4). Assim, quando juntos no lúmen intestinal, o fitosterol, por ser mais hidrofóbico, fica retido na estrutura micelar, enquanto que o colesterol, que não foi degradado em éster de colesterila, acaba perdendo seu lugar na estrutura micelar e por não ser absorvido é eliminado pelas fezes (SANCLEMENTE, 2009).

Recentes estudos revelam que a proteína NPC1L1 está diretamente envolvida no transporte de esteroides para dentro da célula. Um outro transportador o ANXA2-CAV1 também pode estar envolvido nesse mecanismo, mas sua função ainda não é clara. Ademais, tem-se evidências que há outros transportadores que podem estar associados ao mecanismo de transporte dos esteróis como o ABCA1 e receptores CD36, a classe dos receptores tipo SR-B1 ou SCARB1, ABCB1, entre outros (SANCLEMENTE, 2009).

Quando dentro do enterócito o colesterol é esterificado pela acil-coenzima colesterol aciltransferase isoforma 2 (ACAT2) em éster de colesterila ou colesterol esterificado (figura 2), que será assim como o fitosterol, empacotado pelos quilomicrons para serem transportados pelo sistema linfático até a circulação e fígado (SANCLEMENTE, 2009).

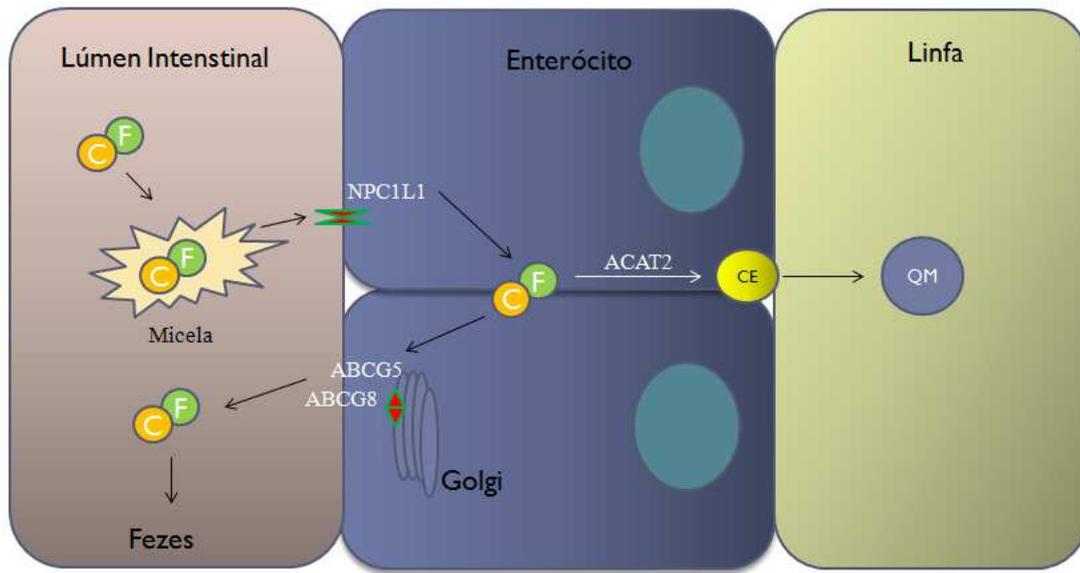


Figura 2. Possível mecanismo de absorção do colesterol e fitosteróis já descrito na literatura. Nos enterócitos o colesterol é esterificado pela acetil-colesterol A aciltransferase 2 (ACAT2). Subsequentemente, os produtos são empacotados nos quilomicrons e são transportados pelo sistema linfático até a circulação hepática. C = colesterol; P = fitosterol; CE = colesterol éster; QM = quilomicrons (adaptado de Sanclemente, 2009).

O mecanismo de transporte dos fitosteróis, dentro do enterócito, é regulado pelas proteínas ABCG5 e ABCG8, as quais se unem para proporcionar um transporte heterodinâmico capaz de levar os fitosteróis até a membrana plasmática e intracelular do Complexo de Golgi dos enterócitos. No entanto, esses transportadores parecem apresentar uma preferência pelos esteróis das plantas, apesar de transportarem também o colesterol, de volta para o lúmen intestinal a proteína transportadora ABCA1 também pode participar desse processo, mas isso ainda não está claro (figura 3) (SANCLEMENTE, 2009). Dessa forma, menos de 5% do fitosterol da dieta é absorvido de fato pelos enterócito e empacotados nos quilomicrons contra 40% da absorção do colesterol da dieta que é transportado pelo mesmo mecanismo (ALLAYEE, LAFFITTE, LUIS, 2000).

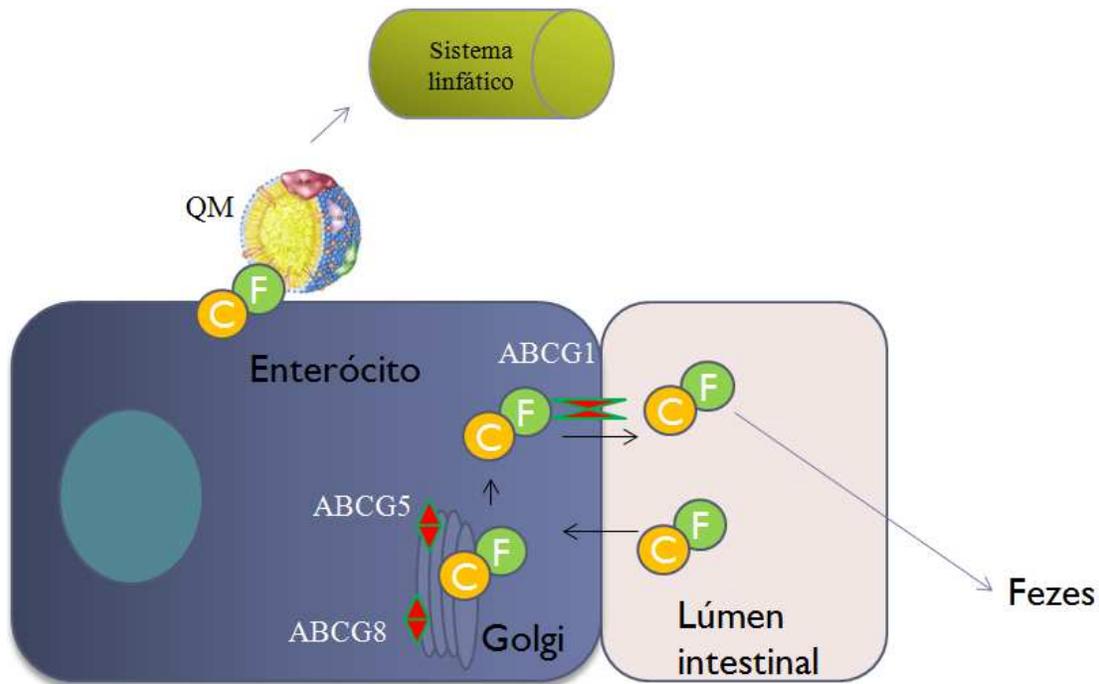


Figura 3. Absorção de colesterol no intestino e potencial mecanismo de ação dos fitosteróis na redução da absorção do colesterol. C: colesterol; P: fitosterol, QM: quilomicrons (adaptado de Patel, 2008).

Segundo a hipótese de Plat e Mensink (2002), baseado em um experimento com animais, os fitosteróis agiriam no aumento da expressão da ABCA1, de forma que poderiam converter um receptor X agonista do fígado (LXR) que ativaria a expressão das proteínas ABC. O receptor LXR tem função central no controle da transcrição do metabolismo de lipídios; uma vez ativado ele está envolvido na absorção do colesterol, efluxo, transporte e excreção (ZELCER; TONTONOV, 2006).

Assim, desordens autossômicas recessivas causadas pela mutação dos genes das proteínas ABC são responsáveis pela doença rara fitosterolemia ou sitosterolemia de forma a gerar uma hiperabsorção de fitosterol bem como de colesterol (IGEL et al., 2003). Além disso, o surgimento de polimorfismo no gene ABCG8 altera a concentração plasmática de fitosterol em animais saudáveis concluindo o papel da ABCG8 na regulação da absorção dos colesterol não esteroidais (BERGER, JONE, ABUMWEIS, 2004).

No fígado, os fitosteróis, assim como os colesterol, podem ser transportados para os tecidos periféricos pela VLDL e LDL, podem ainda serem convertidos em sais

biliares ou apenas transportados para a vesícula biliar para serem excretados. Nos tecidos periféricos o transportador ABCA1 também pode participar desse processo, ele entrega o colesterol para a HDL transportá-lo até o fígado (ALLAYEE, LAFFITTE, LUIS, 2000).

2.4 Ação anti inflamatória e antioxidante

Os fitosteróis são importantes na dieta humana não apenas por apresentar papel fundamental na redução do colesterol plasmático, mas também por apresentar grande potencial para a prevenção do desenvolvimento de DCNT, como a aterosclerose e obesidade (WOYENGO, RAMPRASATH, JONES, 2009).

O aumento da concentração de ácidos graxos e de seus metabólitos tóxicos (acil-CoA lipídico, diacilglicerol, ceramida) no músculo, fígado, adipócitos, células beta e tecidos arteriais contribuem para a disfunção de células beta, aterosclerose acelerada e redução da sensibilidade à insulina em diferentes tecidos (DEFRONZO, 2010). Esta lipotoxicidade pode induzir ao processo de estresse oxidativo e inflamatório, que tem como consequência a resistência a insulina (SOHET et al., 2009).

Quanto ao processo inflamatório este está associado à uma cascata de liberação de citocinas inflamatórias e células imunitárias na corrente sanguínea para promover estabilização do quadro (MOORE; TABAS, 2011).

Fitosteróis presentes na dieta, reduzem a absorção de colesterol biliar e colesterol, e esta propriedade pode estar também relacionada na redução da aterogênese. Animais suplementados com fitosteróis apresentaram elevação da concentração de IL-10 circulante e redução da IL-6 e TNF- α produzidos pelas células do baço com associação da redução de 60% da aterosclerose. De modo que dentre os mediadores anti-inflamatórios estudados e apresentados na literatura, a interleucina 10 (IL-10) tem papel fundamental protetor na doença aterosclerótica (NASHED et al., 2005).

Sendo assim, a associação da redução da absorção do colesterol irá reduzir a existência de LDL oxidada e redução das células imunes, pois a LDL oxidada produz lisofosfatidilcolina e esteróis oxidados, que ativam os macrófagos e células dendríticas a produzirem espécies reativas de oxigênio. A deterioração pós formação fibrosa vai gerar um núcleo necrótico cheio de lipídios. A capa fibrosa formada irá sofrer lesão pelo

processo necrótico estando assim susceptível a ruptura e formação de trombo (NASHED et al., 2005; MOORE; TABAS, 2011).

Consequentemente, pelo processo elucidado irá gerar a secreção e produção de citocinas e espécies reativas de oxigênio, que serão reduzidas na presença de fitosterol que apresenta a finalidade da redução do colesterol circulante. No entanto, não está claro que o tratamento de animais com fitosterol aumente a IL-10 ou se esse aumento é apenas uma consequência da redução do colesterol plasmático promovido pelos fitosteróis (NASHED et al., 2005).

Há possibilidade de que o aumento da concentração do colesterol plasmático altera as células T das membranas, que resulta na alteração da produção de citocinas. As células T estão em um subgrupo da membrana dos linfócitos que são responsáveis pela secreção de IL-10. Outro possível mecanismo, observado pelo estudo de Nashed et al. (2005) é que o fitosterol dietético está direta ou indiretamente ligado na proporção de vários subgrupos das células do baço o que poderia resultar na produção de citocinas pró inflamatórias.

Referências

ALLAYEE, H.; LAFFITTE, B. A.; LUSIS, A. J. An Absorbing Study of Cholesterol. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1709-1711, December 1, 2000 2000. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/290/5497/1709.short> >.

ANDREOLI, M. F. et al. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 445-452, 2009. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900708004383?showall=true> >.

BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Activation of PPAR γ and δ by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 127, n. 3, p. 777-791, 2004. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508504011813> >.

BERGER, A.; JONES, P.; ABUMWEIS, S. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. **Lipids in Health and Disease**, v. 3, n. 1, p. 5, 2004. ISSN 1476-511X. Disponível em: < <http://www.lipidworld.com/content/3/1/5> >.

- CHEN, H. C. Molecular Mechanisms of Sterol Absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 10, p. 2603-2605, October 1, 2001. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/131/10/2603.abstract> >.
- DUFOURC, E. Sterols and membrane dynamics. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, n. 1, p. 63-77, 2008. ISSN 1864-6158. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12154-008-0010-6> >.
- FRITSCHÉ, J. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. **Lipid / Fett**, v. 101, n. 8, p. 272-276, 1999. ISSN 1521-4133. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199908\)101:8<272::AID-LIPI272>3.0.CO;2-W](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199908)101:8<272::AID-LIPI272>3.0.CO;2-W) >.
- GIANCAMILLO, A. D. et al. Dietary conjugated linoleic acids decrease leptin in porcine adipose tissue. **Journal of nutrition**, v. 139, n. 10, p. 1867 - 1872, 2009. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://air.unimi.it/handle/2434/67463>>.
- HOUSE, R. L. et al. Conjugated linoleic acid evokes de-lipidation through the regulation of genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. **Obesity Reviews**, v. 6, n. 3, p. 247-258, 2005. ISSN 1467-789X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789X.2005.00198.x> >.
- IGEL, M.I. et al. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plantsterols, and stanols in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 3, p. 533-538, 2003. Disponível em: < <http://www.jlr.org/citmgr?gca=jlr;44/3/533>>.
- JIANG, S. et al. Conjugated Linoleic Acid Activates AMP-Activated Protein Kinase and Reduces Adiposity More Effectively When Used with Metformin in Mice. **The Journal of Nutrition**, December 1, 2009 2009. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/early/2009/10/14/jn.109.112417.abstract> >.
- KENNEDY, A. et al. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 171-179, 2010. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286309001752> >.
- LAROSA, P. C. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. **Physiological Genomics**, v. 31, n. 3, p. 544-553, November 2007 2007. Disponível em: < <http://physiolgenomics.physiology.org/content/31/3/544.abstract> >.
- MOORE, KATHRYN J.; TABAS, I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-355, 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411004223> >.

MOYA-CAMARENA, S. Y. et al. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . **Journal of Lipid Research**, v. 40, n. 8, p. 1426-1433, August 1, 1999 1999. Disponível em: < <http://www.jlr.org/content/40/8/1426.abstract> >.

NASHED, B. et al. Antiatherogenic Effects of Dietary Plant Sterols Are Associated with Inhibition of Proinflammatory Cytokine Production in Apo E-KO Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 10, p. 2438-2444, October 1, 2005 2005. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/135/10/2438.abstract> >.

O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. C. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1199S-1206S, June 1, 2004 2004. Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/content/79/6/1199S.abstract> >.

OSTLUND, R. E. J.; RACETTE, S. B.; OKEKE, A.; STENSON, W. F. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 1000-4, 2002. Disponível em: < <http://ajcn.nutrition.org/citmgr?gca=ajcn;75/6/1000> >.

PATEL, S. B. Plant sterols and stanols: Their role in health and disease. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 2, n. 2, p. S11-S19, 2008. ISSN 1933-2874. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1933287408000123> >.

PETERS, J. M. et al. Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor α -null mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1533, n. 3, p. 233-242, 2001. ISSN 1388-1981. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138819810100155X> >.

PLAT, J.; MENSINK, R. P. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 10, p. 1248-1253, August 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://www.fasebj.org/content/16/10/1248.abstract> >.

QUÍLEZ, J.; GARCÍA-LORDA, P.; SALAS-SALVADÓ, J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 22, n. 4, p. 343-351, 2003. ISSN 0261-5614. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561403000608?showall=true> >.

RAHMAN, M. M. et al. t10c12-CLA maintains higher bone mineral density during aging by modulating osteoclastogenesis and bone marrow adiposity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 9, p. 2406-2414, 2011. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22578> >.

SANCLEMENTE, T. et al. Role of naturally-occurring plant sterols on intestinal cholesterol absorption and plasmatic levels. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.

65, n. 1, p. 87-98, 2009/03/01 2009. ISSN 1138-7548. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF03165972> >.

SOHET, F.M et al. Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 462–469, 2009. Disponível em: < doi:10.1017/S0007114508191243>.

SUGII, S.; EVANS, R. M. Epigenetic codes of PPAR γ in metabolic disease. **FEBS Letters**, v. 585, n. 13, p. 2121-2128, 2011. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579311003498> >.

THEUWISSEN, E. et al. Plant Stanol Supplementation Decreases Serum Triacylglycerols in Subjects with Overt Hypertriglyceridemia. **Lipids**, v. 44, n. 12, p. 1131-1140, 2009/12/01 2009. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-009-3367-6> >.

WEINGÄRTNER, O. et al. Differential effects on inhibition of cholesterol absorption by plant stanol and plant sterol esters in apoE $^{-/-}$ mice **Cardiovascular Research**, v. 90, n. 3, p. 484-492, 2011. Disponível em: <doi:10.1093/cvr/cvr020>.

WOYENGO T.A; RAMPRASATH V.R; JONES P.J.H. Anticancer effects of phytosterols. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.63, p.813-820,2009.ISSN 0954-3007. Disponível em: <doi:10.1038/ejcn.2009.29>.

ZELCER, N.; TONTONOZ, P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 607-614, 2006. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.jci.org/articles/view/27883> >.

CAPÍTULO 2

CONJUGATED LINOLEIC ACID AND PHYTOSTEROLS COUNTERACT OBESITY INDUCED BY HIGH-FAT DIET

Article accepted by Food Research International

CibelePriscila Busch Furlan; Anne Marques y Castro; Rafaela da Silva Marineli; Mário
Roberto Maróstica Junior

School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6121,
13083-862, Campinas-SP, Brazil.

Abbreviations

CLA (conjugated linoleic acid), AIN-93G (American Institute of Nutrition), GTT (Glucose Tolerance Test), ITT (Insulin Tolerance Test); ANOVA (Analysis of Variance), NPY (Neurons co-expressing Neuropeptide Y), AgRP (Agoutigene-Related Protein), POMC (Neurons Co-expresspro-Opiomelanocortin) CART (Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript)

Abstract

This study aims to evaluate the effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterol supplementation and their combination added to high fat diet to verify their action on the satiety hormones, food intake, weight loss and peripheral glucose intolerance and insulin resistance in healthy rats. Twenty-one-day-old male healthy Sprague-Dawley rats were divided into five groups (n=5): Standard group (P), Standard High-Fat group (HF), and three high-fat groups fed diets with 2% CLA added (HC), 2% phytosterol (HP) and 2% CLA plus 2% phytosterol (HS). The standard diet was AIN-93G with 12% protein and 4% vegetable oil; the high-fat diet contained 12% protein and 35% fat (4% vegetable oil and 31% animal fat). The experimental period lasted 8 weeks. The groups receiving supplements showed a significant reduction of retroperitoneal and epididymal adipose tissue as compared to the HF group ($p < 0.05$). However, there was no improvement in insulin resistance and glucose in either supplemented group ($p < 0.05$). The leptin decreased only in the groups that were receiving CLA ($p < 0.05$). All supplemented groups showed a reduction in diet consumption, but the groups that received the supplements showed weight reduction compared to the HF group ($p < 0.05$). The animals that received the supplements alone or in combination showed reduced fat mass and the effect was potentiated in the group HS, but there was no improvement in ghrelin, adiponectin insulin and glucose resistance. The supplements alone or in combination promoted reduction of food intake and also promoted weight loss in experimental animals.

Key Words: High-fat diet, CLA, phytosterol, regulation of satiety hormones, fat loss.

1. Introduction

Obesity is becoming one of the most serious public health problems worldwide and is generally associated with chronic diseases such as diabetes (Kalupahana et al., 2012). Some food compounds are linked to benefits in health as they modulate oxidative stress, hormones and inflammation (Fahami et al. 2005; Kremyda et al., 2011; Marineli, Marques, Furlan, & Maróstica Jr, 2012; Almoosawi, Prynne, Hardy & Stephen, 2012).

Conjugated linoleic acid (CLA) is a fatty acid found in milk and meat of ruminants. The isomers which exhibited biological activity are CLA *trans*-10, *cis*-12 (*t*-10, *c*-12) and CLA *cis*-9, *trans*-11 (*c*-9, *t*-11) (Vyas, Kadegowda, & Erdman, 2012). The isomer *c*-9, *t*-11 represents approximately 80% of fats produced by ruminants, moreover CLA *c*-9, *t*-11 and *t*-10, *c*-12 are also abundant in commercial mixtures, being approximately 30-40% of each isomer (Andreoli, Gonzalez, Martinelli, Mocchiutti, & Bernal, 2009).

Some previous studies have determined the power of CLA in altering body composition, providing increased lean body mass and decreased fat mass, in order to modulate lipogenesis; furthermore, some researchers have proved that CLA could exert an antioxidant role, possibly by its influence on lipid auto-oxidation (Park & Park, 2007).

Like other lipids, steroidal plant compounds also regulate processes and support the structure of cell membranes. Phytosterols differ minimally from the chemical structure of cholesterol (Ostlund, Racette, Okeke, & Stenson, 2002). They are considered bioactive compounds, since they are responsible for the reduction of LDL cholesterol circulation, as well as reduction in body weight (Brufau, Canela, & Rafecas, 2008). In addition, these compounds are considered to play antioxidant and anti-inflammatory roles, and they are potentially important in preventing the adverse effects of obesity (O'Shea, Bassaganya-Riera, Mohede, 2004; Micallef, Garg, 2009).

Vegetable foods are presented in literature as having an important advantageous effect due to their biological activity and synergy with other foods to minimize or eliminate adverse effects (Jacobs & Steffen, 2003). Recently it was shown that the extract from a marine plant in combination with CLA not only reduced the body weight, but also the adipose tissue, glucose and leptin (Hu et al., 2012).

In this view, the supplementation of CLA in association with the antioxidant protection, like phytosterol, could minimize the deleterious action of CLA and potentiate the anti obesogenic effect. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of CLA and phytosterol supplementation, alone or in combination, in relation to satiety hormones, glucose and insulin resistance, weight loss and adipose tissue, and feed consumption on male Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet.

2. Materials and methods

2.1 Experimental animals and procedures

Twenty-five *Sprague-Dawley* rats, male and newly weaned, were divided in five groups (n=5) randomly, being lodged during the tests in individual metabolic cages. After this division, the animals remained in acclimatization for 7 days and in experiments for 8 weeks.

2.1.1 Animals and experimental design

The animals used in the biological tests were from the University of Campinas Breeding Center. The experiments were subject to the approval of the Ethics Commission on Animal Experimentation (CEEA/UNICAMP) (Permission nº 2417-1) and followed the ethical requirements of the Brazilian College in Animal Experimentation (COBEA).

Twenty-one day old healthy Sprague-Dawley rats were divided into five groups (n=5): Standard group (S), Standard High-Fat group (HF), and three high-fat groups fed diets with 2% CLA added (HC), 2% phytosterol (HP) and 2% CLA plus 2% phytosterol (HS).

The animals were kept in individual cages with water and food 'ad libitum' and remained in a temperature ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) and moisture (60-70%) controlled environment in a cycle of light/dark of 12 hours during the entire experiment.

2.2 Diets and supplements

The formulation of diets followed the recommendations of the *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (Reves, Nielsen, Fahey, 1993); their compositions are shown in Table 1. Two control diets were administered in all experiments: one standard diet, elaborated according to the AIN-93G, with a concentration of crude protein of 12%

(Goena et al., 1989); and a AIN-93G modified hyperlipidemic diet with 12% protein and 35% lipids (4% of vegetable origin, soy oil and 31% of animal origin, swine fat) (Cintra, 2008).

Table 1 Composition of experimental diets (g/kg).

Ingredients	S ^a	HF ^a	HC ^a	HP ^a	has
Casein (85.79% protein)	135.74	135.74	135.74	135.74	135.74
Cornstarch	438.05	261.25	261.25	261.25	261.25
Dextrinized cornstarch	145.47	86.76	86.76	86.76	86.76
Sucrose	110.21	65.78	65.78	65.78	65.78
Soybean oil	70.00	40.00	40.00	40.00	40.00
Safflower oil (linoleic acid)	25.33	24.34	-	-	-
CLA Tonalin®	-	-	24.34	-	24.34
Phytosterols Vegapure®	-	-	-	31.30	31.30
Fat pig	-	310.00	310.00	310.00	310.00
Fiber	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Mineral mix ^b	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
Vitamin mix ^b	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
L-Cystine	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Choline bitartrate	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

^aCaloric diet was very similar amongst the groups. ^b Mineral and Vitamin mix were prepared according AIN-93G (Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993). Group S (Standard): diet AIN-93G + 2% safflower oil. Group HF (High-fat standard): modified AIN-93G diet: 35% (g) lipids, being 4% vegetable origin (soy oil) and 31% animal origin (pork fat). Group HC (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®). Group HP (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% phytosterols (Vegapure®). Group HS (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% of conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) and 2% de phytosterols (Vegapure®).

As for supplements, 2% of the 50:50 (*c*-9, *t*-11 : *t*-10, *c*-12) mixture of CLA and 2% phytosterols were used. All diets were added together with 2% safflower oil in order to balance energy intake (*data not shown*).

Gas chromatography was used to determinate fatty acids (table 2), and phytosterols of the supplements and other lipid sources (phytosterols Vegapure®, CLA Tonalin®, soybean oil, safflower oil and pig fat). Phytosterols were detected in each oil supplement: 10g/100g in soybean oil, 53.98g/100g in Phytosterols Vegapure® and 25.5g/100g in safflower oil. The Phytosterols Vegapure® sample used in this work contained 30% campesterol, 14.5% estigmasterol and 46.6% beta sitosterol.

Table 2. Composition of the supplements' fatty acids used in experimental diets *.

Fatty acids	Oil (%)		CLA Tonalin® (%)	Phytosterol Vegapure® 95FF (%)	Animal Fat (%)
	Soy	Safflower			
C8:0 (Caprylic acid)			0.03		
C10:0 (Capric acid)			0.04		0.09
C12:0 (Lauric acid)		0.04	0.04		0.10
C14:0 (Myristic acid)	0.08	0.10	0.04		1.29
C15:0 (Pentadecanoic Acid)	0.03	0.04			0.08
C16:0 (Palmitic acid)	10.79	6.23	1.85	6.05	23.36
C16:1 cis-9 (Palmitoleic acid)	0.10	0.07	0.03		2.54
C17:0 (Margaric acid)	0.09	0.05	0.05		0.35
C17:1 (Margaroleic acid)	0.05	0.04	0.03		0.25
C18:0 (Stearic acid)	3.06	2.30	2.84	3.70	12.29
C18:1 cis-9 (Oleic acid)	26.34	13.15	13.68	24.04	39.22
C18:2 9-c, 12-t (Trans Linoleic acid)	0.19	0.15	0.44		2.73
C18:2 9-c, 12-c (Linoleic acid)	51.77	76.60	0.32	65.11	15.29
C18:2 9-c, 11-t (CLA)			39.25		
C18:2 10-t, 12-c (CLA)			39.15		
C18:3 trans (Octadecatrienoic acid)	0.55		2.20		
C18:3 (Octadecatrienoic acid)	5.79	0.13		0.47	0.58
C20:0 (Arachidic acid)	0.33	0.35			0.20
C20:1 (Gadoleic acid)	0.23	0.19			1.65
C22:0 (Behenic acid)	0.45	0.23		0.63	
C24:0 (Lignoceric acid)	0.16	0.09			
C24:1 (Nervonic acid)		0.23			
Total	100	100	100	100	100

*Data are expressed as relative percentages of total methyl esters.

2.3 Monitoring of food intake and weight gain of animals

During the experimental period, the diet consumption evaluation and the verification of the weight gain were done every other day and once a week, respectively. Furthermore, the diets were replaced twice a week to minimize lipid oxidation.

2.4 Determination of the hormone levels

Blood samples were collected and transferred to polyethylene tubes without anticoagulant to obtain serum. The tubes were centrifuged at 4°C, 3000 rpm for 10 minutes. Serum and plasma were separated and stored in a freezer at -80 °C until analysis.

Insulin hormones, adiponectin, ghrelin and leptin were determined in the rat's serum using kits from Cayman Chemical and analyzed by the method of Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay (ELISA) by multiplex assays, that consisted, basically, in the capture of antibodies and detection of antibodies specific to the hormones of interest (Leng et al., 2008). For determination of epididymal and retroperitoneal adipose tissue, the tissue was first removed, and then weighed.

2.5 Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT)

The degree of sensitivity to insulin was measured in the last experimental week, through the GTT (indirect) and ITT (direct) methods. Glucose was determined using *Optium Xceed* (Abbott Diabetes Care), using appropriate test strips. The blood samples were collected by the caudal vein of the animals and the results were expressed in mg/dL. For GTT, the experimental animals remained in an overnight fast of 12 hours. After measurement of caudal blood glucose in zero time, glucose was injected into the peritoneal cavity at a concentration of 1.1 mmol/kg of body weight. The samples were collected at 30, 60, 90 and 120 min after injection of glucose solution in order to determine the rate of reduction of blood glucose concentrations. For ITT, the samples were collected at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min after administration into the peritoneal cavity of 0,75Mu/kg of human insulin. The area under the curve (AUC) of glucose was calculated by *Oringin* software (Bonora et al., 1987; De Furia, 2009).

2.6 Statistical analysis

Data were expressed as mean values \pm S.E.M. One-way Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) were used in order to compare the average of the results.

3. Results

3.1 Hormones and adipose tissue

The group supplemented with CLA and CLA plus phytosterols showed a decrease of 22% and 10% in serum leptin ($p < 0.0001$), respectively, compared to HF group (fig. 1 A). The levels of ghrelin and insulin were not altered due to supplementation, and all the high fat groups showed the same results (fig. 1 B and C). But, insulin levels showed to be decreased in the groups supplemented with CLA (7%), phytosterols (15%) and CLA

plus phytosterol group (19%) in comparison to the HF group ($p < 0.05$). The groups supplemented with CLA, phytosterol and the mixture of both showed a decrease in adiponectin of 4%, 5% and 11% respectively, compared to the HF group (fig. 1 D). On the other hand, there were 26% and 53% reductions of fat mass provided by CLA in epididymal and retroperitoneal tissues ($p < 0.0001$). Furthermore, the group supplemented with phytosterol (HP) also showed decreased epididymal (40%) and retroperitoneal (43%) fat (fig 1 E and F). In the same way, the group supplemented with CLA plus phytosterol (HS) showed reductions of 53.5% and 45% in epididymal and retroperitoneal fat.

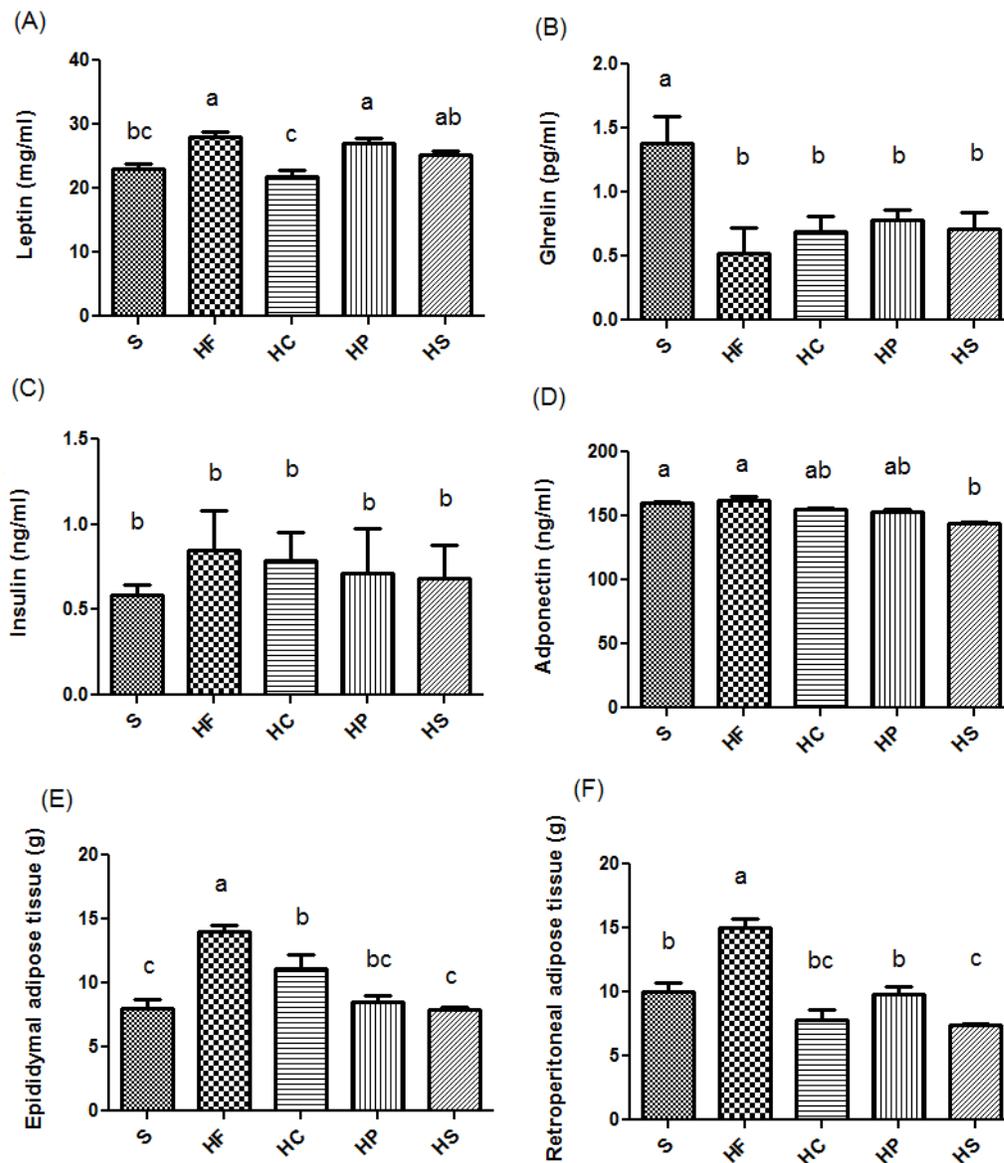


Figure 1. Hormonal profile and adipose tissues weight of the experimental animals at the end of the 65 days experimental period. Hormones were determined, in the rat's serum, using kits and analyzed by the method of Enzyme-Linked Immuno-Sorbant Assay (ELISA). (A) Serum Leptin. (B) Serum ghrelin. (C) Serum insulin. (D) Serum adiponectin. (E) Epididymal adipose tissue. (F) Retroperitoneal adipose tissue. Statistical differences (Tukey's test ($p < 0.05$)). Group S (Standard): diet AIN-93G + 2% safflower oil. Group HF (High-fat standard): modified AIN-93G diet: 35% (g) lipids, being 4% vegetable origin (soy oil) and 31% animal origin (pork fat). Group HC (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched

with 2% conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®). Group HP (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% phytosterols (*Vegapure*®). Group HS (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% of conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) and 2% de phytosterols (*Vegapure*®).

3.2 GTT and ITT

All the hyperlipidic groups developed glucose intolerance and insulin resistance. The groups supplemented with CLA (HC) and CLA plus phytosterol (HS) showed increases in the area under the curve on GTT compared to the standard group (S), and a reduced area under the curve on ITT ($p < 0,05$). Similarly, the group supplemented with phytosterol also presented glucose intolerance, as the area under the curve was increased accompanied by a reduction in ITT, compared to the standard group (S) ($p < 0,05$). These results clearly indicate an increase in glucose intolerance and insulin resistance in the supplemented groups compared to standard group (S).

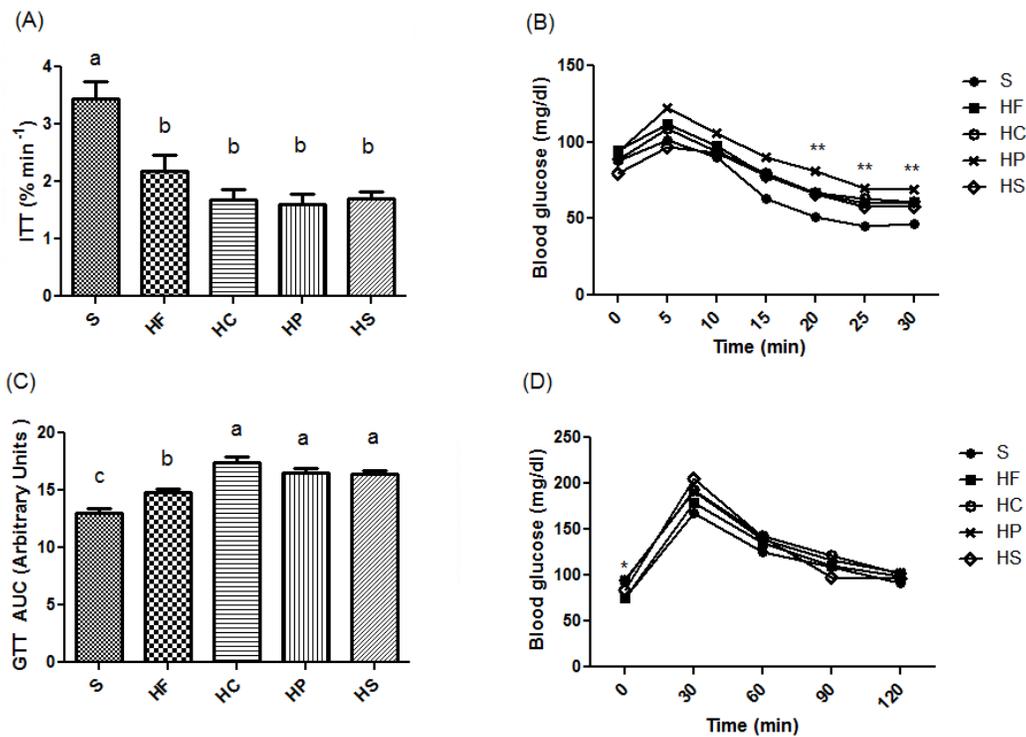


Figure 2. Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT) of experimental animals. The blood samples were collected by the caudal vein of the animals, using appropriate test strips. (A) Area of the decay rate curve by the ITT. (B) Decay rate curve blood glucose by the ITT over time (min.). (C) Area under the curve by the GTT. (D) Decay rate curve blood glucose by the GTT during the time (min.). Statistical differences (Tukey's test ($p < 0.05$)) are represented by * or ** (* indicates statistical difference from the HF and S groups for the HC and HP groups; ** indicates statistical difference from the standard group for the HP group). Group S (Standard): diet AIN-93G + 2% safflower oil. Group HF (High-fat standard): modified AIN-93G diet: 35% (g) lipids, being 4% vegetable origin (soy oil) and 31% animal origin (pork fat). Group HC (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®). Group HP (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% phytosterols (Vegapure®). Group HS (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% of conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) and 2% de phytosterols (Vegapure®).

3.3 Feed consumption and body weight loss

Group S showed the highest diet ingestion followed by groups HF and HP. On the other hand, the groups that received CLA and CLA plus phytosterol (HC and HS, respectively) showed lower food consumption. However, the group supplemented with CLA showed similar energy intake compared to group S; the rats that received phytosterols (HP) had a 20% reduction in energy intake compared to HF.

However, the group that received both supplements showed an increase of 11% in the energetic intake compared with the standard High-fat group ($p < 0.05$). The body weight of the HF group was similar to group S and higher compared to the other groups. The groups supplemented with CLA, phytosterol and CLA plus phytosterol showed weight reductions of 6%, 13.5% and 17%, respectively, compared to the standard High-fat group ($p < 0.0001$).

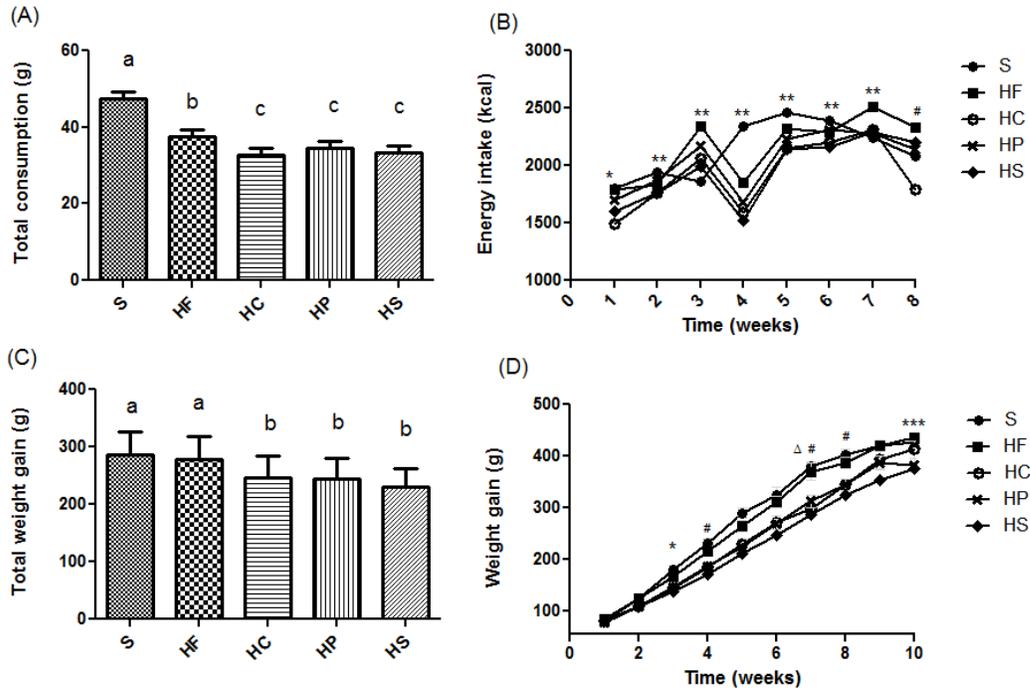


Figure 3. Weight gain and reduction of the energetic intake of the rats supplemented with 50:50 mixture of CLA and phytosterols during the 65 days of experiment. Consumption was calculated by the weight diet offered less leftover. (A) Total intake ingested. (B) Total energy intake during the experimental weeks (C) Weight gain of the experimental animals. (D) Weight increase of the experimental animals during the weeks of experiment. Statistical differences (Tukey's test ($p < 0.05$)) are represented by *, **, ***, # or Δ (* indicates statistical difference from the standard group for the HC and HF group; ** indicates statistical difference from the standard group regarding other; *** indicates statistical difference for the HF group the HP; # indicates statistical difference from the standard group for the supplemented groups; Δ indicates statistical difference from the HF group for the supplemented group HC and HS). Group S (Standard): diet AIN-93G + 2% safflower oil. Group HF (High-fat standard): modified AIN-93G diet: 35% (g) lipids, being 4% vegetable

origin (soy oil) and 31% animal origin (pork fat). Group HC (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®). Group HP (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% phytosterols (*Vegapure*®). Group HS (High-fat Enriched Experimental): standard high-fat diet enriched with 2% of conjugated linoleic acid (CLA Tonalin®) and 2% de phytosterols (*Vegapure*®).

4. Discussion

The complex interaction between adipokine (adiponectin, leptin and ghrelin) and insulin promotes direct effects in feed consumption and weight gain, which play a role in the modulation of insulin resistance and glucose intolerance (Elbatarny et al., 2007). Former studies already demonstrated the effect of leptin reduction in several models of animals with induced obesity through a high-fat diet (Ricci, & Bevilacqua, 2012), but many investigations reported the reduction of leptin by supplemented CLA using normal and high-fat diets (Rahman et al., 2001; Parra, Serra, & Palou, 2010). In this context, leptin is an important hormone responsible for feed consumption and body weight reduction in rodents (Roubos et al., 2012).

Leptin resistance and hyperinsulinemia are common in obese individuals (Schwartz et al., 2000). In this study, the HF group presented leptin resistance, as well as the group that received phytosterol. On the other hand, there was a reduction of the serum leptin in the group supplemented with CLA and CLA plus phytosterol, showing that the CLA and not phytosterol acts on the action mechanism of this hormone derivative from adipocytes. An investigation conducted by Park and Park (2010) revealed that diet supplementation with CLA reduces adipose tissue by a mechanism involving hormone-sensitive lipase and leptin.

Some researchers have supported that CLA and phytosterols could act on a reduction of lipids in adipose tissue. Furthermore, CLA, mainly 10-*trans*, 12-*cis* CLA isomers, seems to be responsible for inducing inflammatory signaling in both mouse and human adipocytes 'in vitro' and 'in vivo' (Belda et al., 2012). Leptin secretion is directly proportional to increased fat in adipocytes. Kennedy et al. (2010) showed that the

supplementation of rodents with 10-trans,12-cis CLA could promote an activation of inflammatory proteins and induction of inflammatory genes, which interfere with PPAR γ transcriptional activation of target genes such as lipoprotein lipase, adiponectin (AMP1) and aP2-GLUT4. In this inflammatory condition, an imbalance or deregulation of the macrophages signalization attracted to adipocytes could directly influence the sensibility to leptin. The macrophages assume the proinflammatory conformation (M1) in rats fed with the obesity-inducing diet, aggravating the inflammation. However, another conformation of the macrophage (M2) assumes a reliever role of the inflammatory condition and directly influences the PPAR δ and PPAR γ , which are responsible for the lipid metabolism, reducing the development of fat accumulation in adipose tissue (Lumeng, & Saltiel, 2011).

The mechanisms by which phytosterols promote a reduction on adipose tissue have not been fully elucidated to date. Ebine et al. (2006) showed that phytosterol supplementation reduced the epididymal and retroperitoneal adipose tissues as well as weight gain. It is known that phytosterols act directly on intestinal energy absorption and reduce LDL leading to a reduction in atherosclerosis and development of inflammation. More investigations are needed to clarify the biological effects of phytosterols as well as their mechanisms.

According to Misawa et al. (2008) and Misawa et al. (2012), rats and mice supplemented with Aloe Vera phytosterols also presented reduction of the epididymal and retroperitoneal adipose tissue, food intake and body weight. The adipose tissue reduction is directly related to the reduction of cardiovascular diseases and improved quality of life (Farber et al., 2011). In this way, it can be stated that the consumption of phytosterol, decreases the risk of cardiovascular disease (Marangoni, & Poli, 2010) and metabolic syndrome, since the weight reduction is also associated with the reduction of hypertension and resistance to insulin and glucose (Sanclementea et al., 2012).

On the other hand, glucose intolerance and insulin resistance were detected in the group that received the high-fat diet and high-fat diet plus supplementation. Insulin suppresses hepatic glucose production, promotes skeletal muscle glucose and inhibits lipolysis (Olefsky, & Glass, 2010). A chronic low-grade inflammation (subclinical) promoted by macrophage infiltration in adipose tissue gives rise to excessive production of

pro-inflammatory cytokines leading to insulin resistance (Festa et al., 2000). CLA and phytosterols failed to improve insulin sensitivity in experimental animals, even reducing significantly the adipose tissue.

Adiponectin is considered an indicator of a possible cardio-metabolic-risk development and acts on the increase of sensibility to insulin and fatty acid oxidation, improves glucose uptake and suppresses the production of hepatic glucose (Ricci, & Bevilacqua, 2012). But the relationship between plasma adiponectin levels and obesity-related and comorbidities has not been fully clarified. It is possible that *Adiponectin gene* is located on chromosome 3q27, which has been reported to be linked to type 2 diabetes and metabolic syndrome. In this way, a reduction in plasma adiponectin levels, caused by interactions between genetic factors, and associated with environmental factors such as a sedentary lifestyle are crucial for the development of obesity (Kadowaki et al, 2006).

Unfortunately, although expected, there was no increased of adiponectin in supplemented groups compared to the High-fat group. Pérez-Matute et al. (2007) showed that CLA supplementation promoted reduction of serum adiponectin and leptin in isolated rat adipocytes. This was an expected result, because the PPAR γ is also responsible for the transcription of this adipokine, and once suppressed, it will also reduce the production of adiponectin, increasing insulin resistance and glucose intolerance (Gayet et al., 2007; Park, & Pariza, 2007). Moreover, another study (Kouji et al. ,2011) shows that *Aloe Vera* phytosterols act as PPAR γ ligands increasing its expression, but there was no improvement of adiponectin in our study in the groups supplemented with phytosterol.

All the groups supplemented with CLA and phytosterol showed significant reduction of energetic intake (except the HS group which presented an increase of 11%), food intake and body weight. All diets contained 2% safflower oil. In the study of Hsu and Huang (2007), rats and mice supplemented with high-fat diets plus 5%, 20% and 30% of safflower oil presented a reduction of the food and energy intakes. Marques et al. (2012) showed that in mice that ingested high-fat diets supplemented with 2% of CLA and 2% CLA plus 2% of phytosterol did not present statistical difference in energy intake; however, the authors found a 35% reduction in body weight in both groups.

According to Ebine et al. (2006), the phytosterol ester (also present in phytosterols covalently bound to ascorbic acid), is transformed into disodium ascorbyl phytostanyl phosphate when ingested together with the diet. The latter seems to be the responsible agent for the effect on reduction of body weight gain and consumption, but the mode of action is still not known.

The modulation of diet intake by CLA seems to be related to the action of leptin in the hypothalamus (Wang, & Jones, 2004). The central nervous system (CNS) is responsible for controlling the food intake and weight gain, and the leptin acts in CNS playing a role in homeostasis of energy regulation and signaling in the hypothalamus, specifically in the arc ventricular (Morton et al., 2006). The neurons co-expressing neuropeptide Y (NPY) and agoutigene-related protein (AgRP) are strong appetite stimulants. On the other hand, in the hypothalamic arcuate nucleus, the proteins co-express pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) inhibit appetite (Flier, 2004). Leptin activates the neurons POMC/CART and inhibits NPY/AgRP (Morton et al., 2006), reducing food intake and stimulating energy expenditure.

In addition, it was confirmed by Cao et al. (2007), that the CLA also inhibits the NPY/AgRP by reducing the mRNA expression, but does not interfere with the stimulation or inhibition of POMC, indicating a possible anorectic effect of CLA. Cao used a mixture of CLA (*c*-9,*t*-11 : *t*-10, *c*-12 , 50%:50%) added to the Sprague-Dawley diet and observed a reduction of body weight and epididymal and retroperitoneal adipose tissue accompanied by a reduction of food intake. These results agree with our study.

Ghrelin has a fundamental role in the process of stimulation, production and secretion of orexigenic neuropeptides suppressed by POMC (Stevanovic et al., 2012). In the study by Gomes et al. (2012) rats fed with high-fat showed 20% and 29% reductions in total plasma ghrelin levels after 10 and 60 weeks, respectively.

According to Briggs et al. (2010), there is a resistance to the action of plasmatic ghrelin by reduction of response and the suppression of NPY/AgRP in obesity. Ghrelin levels show negative correlation with leptin, insulin and body fat according to investigations performed by Tschop et al. (2001), Punell et al. (2003) and Zhu et al. (2010).

In our study, ghrelin levels were low in the supplementary groups as well in the high-fat standard group.

5. Conclusion

In summary, diet supplementations with CLA, phytosterols or their combination, for 65 days were effective in reducing body fat, adipose tissue and feed consumption. Furthermore, CLA, but not phytosterols, modulated the action of leptin in obesity. Both supplements did not reverse the process of glucose intolerance and insulin resistance resulting from obesity induced by a high-fat diet. More research must be performed, mainly in the investigation of the action mechanisms of phytosterols and of CLA plus phytosterols.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Cognis Brasil Ltda for supplemental donations.

References

- Almoosawi¹, S., Prynne¹, C. J., Hardy, R., & Stephen, A. M. (2012). Time-of-day and nutrient composition of eating occasions: prospective association with the metabolic syndrome in the 1946 British birth cohort. *International Journal of Obesity*, doi: 10.1038/ijo.2012.103.
- Andreoli, M. F., Gonzalez, M. A., Martinelli, M. I., Mocchiutti, N. O., & Bernal, C. A. (2009). Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 25 (4), 445-452.
- Belda, B.J., Thompson, J.T., Eser, P.O., & Vanden-Heuvel, J.P. (2012). 10e12z CLA alters adipocyte differentiation and adipocyte cytokine expression and induces macrophage proliferation. *The Journal Nutritional Biochemistry*, 23, 510-8.
- Bonora E, Manicardi V, Zavaroni I, et al. (1987) Relationships between insulin secretion, insulin metabolism and insulin resistance glucose intolerance. *Diabetes Metab*, 13,116-121.

- Briggs, D.I., Enriori, P.J., Lemun, M.B., Cowley, M.A., & Andrews, Z.B. (2010). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology*, 151, 4745-4755.
- Brufau, G., Canela, M.A., & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 271-225.
- Cao, Z.P., Feng, W., Xiang, X.S., Cao, R., Zhang, W.B., & Gao, S.B. (2007). Intracerebroventricular administration of conjugated linoleic acid (CLA) inhibits food intake by decreasing gene expression of NPY and AgRP. *Neuroscience Letters*, 48, 217-221.
- Cintra, D.E.C. Integração entre vias metabólicas e inflamatórias durante a esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica. 2008. Thesis (Doctorate in Medicine) - University of Campinas, Campinas, 2008.
- De Furia, J., Bennett G., Strissel, K.J., et al. (2009). Dietary Blueberry Attenuates Whole-Body Insulin Resistance in High Fat-Fed Mice by Reducing Adipocyte Death and Its Inflammatory Sequelae. *Journal of Nutrition*, doi:10.3945/jn.109.105155.
- Ebine, N., Demonty, I., Jia, X., & Jone, P.J.H. (2006). Plant stanol ascorbate esters reduce body weight gain through decreased energy absorption in hamsters. *International Journal of Obesity*, 30, 751-757.
- Elbatarny, H.S., Netherton, S.J., Ovens, J.D., Ferguson, A.V., & Maurice, D.H. (2007). Adiponectin, ghrelin, and leptin differentially influence human platelet and human vascular endothelial cell functions: Implication in obesity-associated cardiovascular diseases. *European Journal of Pharmacology*, 558, 7-13.
- Faber, M. G., Bigornia, B., Mott, M., MS, Tanriverdi, K., Morin, K. M., Freedman, J.E., Joseph, L., Hess, D.T.; Apovian, C. M., Vita, J. A., Gokce, N.(2011). Reduced Adipose Tissue Inflammation Represents an Intermediate Cardiometabolic Phenotype in Obesity. *Journal of the American College of Cardiology*, 58, 232 – 237.
- Fahami, N.A.M., Ismail, M.N., & Kadir, K.B.A. (2005). Phytonutrients: experimental effects on gastric lesions in rats exposed to acute repetitive restraint stress. *Nutrition & Food Science*, 35, 403 – 409.
- Festa, A.; D'Agostino, R. Jr., Howard, G., Mykka'nen, L., Tracy, R.P., & Haffner, S.M. (2000). Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance

- Syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*, 102, 42-47.
- Flier, J.S. (2004). Obesity Wars: Molecular Progress Confronts an Expanding Epidemic. *Cell*, 116, 337–350.
- Gayet, C., Leray, V., Saito, M., Siliart, B., & Nguyen, P. (2007). Effects of obesity-associated insulin resistance on mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target gene, in dogs. *British Journal Nutrition*, 98, 497-503.
- Goena, M., Marzo, F., Fernández-González, A.L., Tosar, A., Frühbeck, G., & Santidrián, S. (1989). Effect of the raw legume Vicia ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Revista Española de Fisiología*, 45, 55-60.
- Gomes, G., Han, S., Englander, E.W., & Greeley, Jr. G.H. (2012). Influence of a long-term high-fat diet on ghrelin secretion and ghrelin-induced food intake in rats. *Regulatory Peptides*, 173, 60-63.
- Hsu, S.C., & Huang, C. (2007). Changes in liver PPAR α mRNA expression in response to two levels of high-safflower-oil diets correlate with changes in adiposity and serum leptin in rats and mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 86-96.
- Jacobs, D. R., & Steffen, L. M. (2003). Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3), 508S-513S.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 1784–1792.
- Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., & Claycombe, K.J. (2012). Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 26–34.
- Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S., LaPoint, K., & McIntosh, M. (2010). Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 171-9.
- Kouji, N., Miyuki, T., Eriko, M., Muneo, Y., Tomohiro, T., Keiji, I., Tsuyoshi, G., & Teruo, K. (2011). Aloe vera phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. *Obes Res Clin Pract*, 5 (3), e190-e201.

- Kremyda, L.S., Tvrzick, E., Stankova, B., & Zak, A. (2011). Fatty acids biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – A review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* , 155, 117-30.
- Leng, S.X., McElhaney, J.E., Walston, J.D., Xie, D., Fedarko, N.S. & George A. Kuchel (2008). Elisa and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *Journal of Gerontology: Biological Sciences and the Journal of Gerontology: Medical Sciences*, 63, 879–884.
- Lumeng, C.N., & Saltiel, A.R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 2111–2117.
- Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61, 193-199.
- Marineli, R. d. S., Marques, A. y. C., Furlan, C. P. B., & Maróstica Jr, M. R. (2012). Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. *Food Research International*, 49 (1), 487-493.
- Marques, A.C., Dragano, N.R.V., & Maróstica-Júnior, M.R. (2012). Redução do peso e da glicemia resultante da suplementação de ácido linoleico conjugado e fitosteróis à dieta hiperlipídica de camundongos. *Ciência Rural*, 42, 374-380.
- Micallef, M.A., & Garg, M.L. (2009). Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 927-39.
- Misawa, E., Tanakaa, M., Nomaguchia, K., Yamadaa, M., Toidaa, T., Takaseb, M., Iwatsukia, K., & Kawadac, T. (2008). Administration of phytosterols isolated from Aloe vera gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Obesity Research & Clinical Practice*, 2, 239–245.
- Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Nabeshima, K., Yamada, M., Toida, T., & Iwatsuki, K. (2012). Oral Ingestion of Aloe vera Phytosterols Alters Hepatic Gene Expression Profiles and Ameliorates Obesity-Associated Metabolic Disorders in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (11), 2799-2806.

- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., & Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443, 289-295.
- Olefsky, J.M., & Glass, C.K. (2010). Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annual Review of Physiology*, 72, 219-246.
- O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J., & Mohede, I. C. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (6), 1199S-1206S.
- Ostlund, R. E., Racette, S. B., Okeke, A., & Stenson, W. F. (2002). Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75 (6), 1000-1004.
- Park, Y., & Pariza, M.W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40, 311–323.
- Park, Y., & Park, Y. (2010). Conjugated nonadecadienoic acid is more potent than conjugated linoleic acid on body fat reduction. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 764–773.
- Parra, P., Serra, F., & Palou, A. (2010). Moderate doses of conjugated linoleic acid isomers mix contribute to lowering body fat content maintaining insulin sensitivity and a noninflammatory pattern in adipose tissue in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 107–115.
- Pérez-Matutea, P., Martia, A., Martíneza, J.A., Fernández-Oteroa, M.P., Stanhopeb, L.K., Havelb, P.J., & Moreno-Aliaga, M.J. (2007). Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 268, 50–58.
- Purnell, J.Q., Weigle, D.S., Breen, P., & Cummings, D.E. (2003). Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88, 5747-5752.
- Rahman, S.M., Wang, Y., Yotsumoto, H., Cha, J., Han, S., Inoue, S., & Yanagita, T. (2001). Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition*, 17, 385-90.

- Reves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey, J.R.G.C. (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. *Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.
- Ricci, R., & Bevilacqua, F. (2012). The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *The Veterinary Journal*, 191, 292-298.
- Roubos, E.W., Dahmen, M., Kozicz, T., & Xu, L. (2012). Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis. *General and Comparative Endocrinology*, 177, 28–36.
- Sanclemente, T., Marques-Lopes, I., Fajó-Pascuala, M., & Puzoa, J. (2012). Beneficios dietéticos asociados a la ingesta habitual de dosis moderadas de fitoesteroles presentes de forma natural en los alimentos. *Clínica e investigación en Arteriosclerosis*, 24, 21-29.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D. Jr., Seeley, R.J., & Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-71.
- Stevanovic, D., Starcevic, V., Vilimanovich, U., Nestic, D., Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Savic, E., Popadic, D., Sudar, E., Micic, D., Sumarac-Dumanovic, M., & Trajkovic, V. (2012). Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26, 150-158.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E., & Heiman, M.L. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50, 707-709.
- Vyas, D., Kadegowda, A. K. G., & Erdman, R. A. (2012). Dietary Conjugated Linoleic Acid and Hepatic Steatosis: Species-Specific Effects on Liver and Adipose Lipid Metabolism and Gene Expression. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.
- Wang, P., Mariman, E., Renes, J., & Keijer, J. (2008). The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *Journal of Cellular Physiology*, 216, 3–13.
- Wang, Y.W., & Jones, P.J.H. (2004). Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *International Journal of Obesity*, 28, 941-955.
- Zhu, J.F., Liang, L., Zou, C.C., & Fu, J.F. (2010). Plasma ghrelin levels and polymorphisms of ghrelin gene in Chinese obese children and adolescents. *Irish Journal of Medical Sciences*, 179, 345-349.

CAPÍTULO 3

REDUÇÃO DE GOTAS DE GORDURA NO FIGADO DE RATOS SUPLEMENTADOS COM CLA E OU FITOSTEROL

Artigo a ser submetido na Revista British Journal of Nutrition

CibelePriscila Busch Furlan 1; Anne Marques y Castro; Rafaela da Silva Marineli1; Soraia neves 3; AureoTatsumi Yamada 2; Fabio Augusto 3; Mário Roberto Maróstica Junior1.1

1 Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

2 Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

3 Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, Brasil.

Resumo

Ácido linoléico conjugado (CLA) e o fitosterol apresentam efeito na redução da esteatose hepática e melhora do sistema antioxidante. Nesse contexto, o objetivo deste estudo é verificar o efeito do CLA e/ou fitosterol nas enzimas do estresse oxidativo, bem como a peroxidação lipídica. Ratos Sprague-Dawley de 21 dias de vida foram divididos em 5 grupos (n = 8): Grupo padrão (S), Grupo padrão *High-Fat* (HF) e três grupos *high-fat* com adição de CLA (HC), fitosterol (HP) e fitosterol mais CLA (HS). O período experimental durou 65 dias. Houve redução das enzimas antioxidantes bem como da glutathiona total e redução de 8-F₂-isoprostana e MDA plasmático nos grupos que receberam CLA e fitosterol, comparado com o grupo *high-fat* padrão. No fígado houve aumento de MDA para todos os grupos que receberam dieta *high-fat*, por outro lado, houve redução de peso do fígado e da área das gotas de gordura hepática nos animais que receberam os suplementos. CLA e fitosteróis conseguiram reduzir a esteatose hepática não alcoólica, ácidos graxos saturados circulantes e aumentaram os ácidos graxos polinsaturados.

1. Introdução

O desequilíbrio nutricional causado pelo consumo de alimentos mais energéticos associado ao sedentarismo desencadeia a obesidade (Mangou et al., 2012). Caracterizada por ser uma doença de desordem metabólica, é responsável direta pela diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doença hepática não alcoólica (DHGNA), devido a inflamação crônica subclínica que causa (Vyas et al., 2012).

DHGNA geralmente é assintomática e apresenta aumento dos glóbulos de gordura no fígado pelo acúmulo de lipídios em forma de triglicérides, que dispara a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e interleucinas (Gregor & Hotamisligil, 2011). A presença constante de citocinas pró-inflamatórias ao longo de anos gera a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) que é caracterizada pela presença de inflamação resultando no recrutamento de infiltrados de células imunes como as células de Kupffer, o que leva a apoptose e fibrose celular (Sun & Karin, 2012).

A progressão desse quadro inflamatório prejudica a função mitocondrial ocasionando prejuízo na oxidação dos ácidos graxos e produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (Romero-Sarmiento, Soto-Rodríguez, Arzaba-Villalba, García, & Alexander-Aguilera, 2012; Sun & Karin, 2012). O estresse oxidativo é um processo resultante do desequilíbrio entre a formação das espécies reativas de oxigênio ou outros

pró-oxidantes e o limite de defesa do sistema antioxidante, que é o gatilho para agravar o dano já instalado pela inflamação levando à cirrose hepática, hepatocarcinogênese e falência do fígado (Rolo, Teodoro, & Palmeira, 2012).

No entanto, existem meios de reverter o quadro de DHGNA e EHNA, gerados pela obesidade e inflamação, por meio da redução de massa corporal com exercício físico e controle dietético (Gregor & Hotamisligil, 2011). Além disso, há alimentos que potencializam a redução de massa gorda, como é o caso de alguns lipídios bioativos como o ácido linoléico conjugado (CLA) e o fitosterol (Vyas et al., 2012). Esses compostos apresentam efeito na redução da gordura corporal com preservação da massa magra e redução do estresse oxidativo, porém efeitos adversos como esteatose hepática já foram verificados no CLA (Ebine, Demonty, Jia, & Jones, 2006; Mannarino et al., 2009; Park & Pariza, 2007).

Nesse sentido, o escopo do presente trabalho foi investigar a ação do CLA e dos fitosteróis sobre os efeitos hepáticos e sua influencia na modulação do sistema antioxidante, em ratos *Sprague-Dawley* induzidos à obesidade por dieta *high-fat*.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais experimentais e procedimentos

Quarenta ratos da espécie *Sprague-Dawley*, machos e saudáveis foram divididos em cinco grupos (n=8) aleatoriamente, mantidos em gaiolas metabólicas individuais por todo o período de experimento. Após a divisão, os animais permaneceram 7 dias em aclimação e 65 dias em experimento.

2.2 Animais: características e desenho experimental

Os animais utilizados para o teste biológico são originários do Biotério Central da Unicamp (CEMIB) da Universidade de Campinas (Unicamp). O experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP) (Permissão nº 2417-1) e seguiu os termos éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os quarenta ratos *Sprague-Dawley* foram divididos em cinco grupos (n=8): grupo padrão (S), grupo padrão *High-Fat* (HF), e três grupos que receberam dieta padrão *high-fat* experimental com adição de 2% de CLA (HC), outra com adição de 2% fitosterol (HP) e o ultimo com adição de 2% de CLA mais 2% fitosterols (HS).

Os animais foram mantidos no sistema de livre acesso a água e comida em ambiente de temperatura e umidade controlados: $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 60-70% respectivamente, e com ciclo claro/escuro de 12 horas durante todo o período experimental.

2.3 Dietas e suplementos

A formulação das dietas seguiram as recomendações da *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (Reves, Nielsen, Fahey, 1993). As dietas padrão foram administradas em todo o experimento e elaboradas de com concentração de 12% de proteína (GOENA et al., 1989); e a dieta padrão *high-fat* com 12% de proteína e 35% de lipídios, sendo 4% de óleo vegetal (óleo de soja) e 31% de origem animal (gordura suína) (Cintra. 2008).

Quanto aos suplementos foram utilizados 2% da mistura dos isômeros de CLA *trans-10,cis-12* (*t-10,c-12*) e CLA *cis-9,trans-11* (*c-9, t-11*) e 2% de fitosteróis. Todas as dietas apresentaram em sua composição 2% de óleo de cártamo para igualar a energia (*dados não apresentados*).

2.4 Enzimas do estresse oxidativo e marcadores de oxidação lipídica

Os marcadores do estresse oxidativo superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRd) e marcador antioxidante endógeno glutaciona total (GSH) bem como a 8-iso-PGF 2α -isoprostana foram analisados por meio de kits comerciais com leitura da absorbância em ELISA (Santos-Zago, Botelho, & de Oliveira, 2007). Para a determinação do ácido tiobarbitúrico (TBARS – segundo produto da oxidação de lipídios), o método proposto utilizado foi por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). O método é baseado na formação de pigmentos avermelhados composto por 2 moléculas de ácido tiobarbitúrico e 1 de malondialdeído (MDA). Os resultados são expressos em nmol de MDA/kg peso do fígado e em nmol de MDA/ml para a análise no plasma dos animais (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979).

2.5 Análise microscópica do tecido hepático

Foram selecionados, aleatoriamente, três animais de cada grupo do experimento totalizando n=15 para análise do tecido hepático de forma a quantificar a presença de glóbulos de gordura. O preparo das amostras foi realizado de acordo com as instruções do kit comercial Embedding® LAICA HistoResina.

O fígado de cada animal foi retirado, lavado com solução fisiológica e realizado um corte de 3mm³ no glóbulo direito do órgão. A amostra foi colocada em uma solução fixadora de formol-cálcio (3 g de cloreto de cálcio em 100ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0.1M pH7.4) durante 24-48 horas a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, o processo de lavagem ocorreu em tampão fosfato 0.05M em pH 7.4 por 3 vezes. A desidratação foi em gradiente crescente de etanol em água. Ao final desse processo, foi preparado uma mistura para embebição em historesina. Primeiramente, na proporção etanol:resina 1:1 e depois etanol:resina 1:2 ambos permaneceram nessas proporções por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada resina pura (overnight). Logo após, foi acrescentado resina pura com acelerador por mais 1 hora finalizando a polimerização.

Para análise da área das gotas de gordura foi primeiramente escolhido uma região ao redor do sistema porta-hepático, pois as gotas de gordura são identificadas nos hepatócitos principalmente ao redor da veia central, indicando fortemente o início do processo de esteatose (Inoue et al., 2005). Em seguida, a imagem era registrada por uma câmera para posterior cálculo de área pelo programa Image-Pro Plus.

2.6 Análise cromatográfica do soro dos animais

Para a aplicação da MPCA (Análise de Componentes Principais Multimodo) e cromatografia bidimensional, para o soro de rato, sob diferentes dietas foram utilizadas solução aquosa saturada de CH₃ONa 99% e iso octano. Para extração dos ácidos graxos das amostras, que foram realizadas por LPME (microextração líquido-líquido), foram utilizados frascos de fundo cônico com capacidade de 250 µL. Testou-se diferentes proporções entre volume de amostra, iso octano e solução de CH₃ONa. As proporções testadas foram 50:200:50, 60:130:60, 70:110:70 e 80:90:80. As amostras foram

descongeladas e homogeneizadas. Ao frasco de fundo cônico adicionava-se a amostra, o isoctano e a solução, agitava-se no vortéx por 2 minutos. Aguardava-se a separação de fases por 1 minuto, e o sobrenadante era injetado no cromatógrafo. Para análise por cromatografia gasosa, utilizou-se um cromatógrafo Agilent 5890 com detecção por FID, no próprio laboratório, sendo as condições cromatográficas mostradas a seguir: set de colunas HP-5–Spwax, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 250°C, sendo o forno com temperatura inicial de 170°C, com um aumento de 5°C por minuto até 270°C, onde permaneceu por mais 5 minutos, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, H₂ como gás de araste e período de modulação de 6 segundos.

Para verificação do perfil cromatográfico das amostras de soro de rato, foi realizada uma análise exploratória, ou MPCA. Para dados de ordem superior foi necessário empregar a extensão multilinear (MPCA, Análise Multilinear de Componentes Principais). Os dados na forma de arranjo tridimensional foram decompostos por MPCA na soma do produto de vetores e matrizes pesos, mais uma matriz de resíduos.

Para realização desta análise foram utilizados os cromatogramas brutos entre 4 e 14 minutos. As análises foram realizadas utilizando o programa MATLAB versão 7.9.0 e o PLStoolbox 5.22.

2.7 Análise estatística

Os dados são expressos em valores de média \pm desvio padrão. Análise de Variância (ANOVA) One-way e teste de Tukey's ($p < 0.05$) foram usados em ordem para comparar as médias dos resultados para os dados paramétricos, e para dados não paramétricos foram utilizados testes de Kruskal-Wallis.

3. Resultados

3.1 Perfil do estresse oxidativo

As enzimas do sistema antioxidante, CAT e GPx, apresentaram-se reduzidas nos grupos suplementados com CLA, fitosterol e CLA mais fitosterol ($p < 0.05$) (fig. 1B e E), mas o SOD apresentou redução apenas no grupo suplementado com CLA mais fitosterol comparado com o grupo high-fat padrão ($p < 0.05$) (fig. 1A). A enzima glutathiona reduziu também em todos os grupos suplementados (fig. 1C), no entanto a GRd reduziu

apenas nos grupos com CLA e fitosterol comparado com o grupo high-fat padrão e o grupo que recebeu ambos suplementos apresentou a mesma quantidade de GRd que o grupo padrão (S) (fig. 1D).

Os marcadores de dano lipídico MDA e 8-isoprostana apresentaram-se alterados no plasma. O MDA reduziu no grupo suplementado com fitosterol, no entanto o grupo que recebeu CLA, apesar de apresentar redução do marcador não apresentou diferença em relação ao grupo high-fat padrão e o grupo que recebeu CLA mais fitosterol apresentou maior quantidade de MDA. quando comparado com o grupo high-fat padrão ($p < 0.05$) (fig 1F). Houve redução da lipoperoxidação plasmática pelo marcador 8-isoprostana. que apresentou redução de aproximadamente 35% nos grupos suplementados com CLA e fitosterol e 23% no grupo suplementado com ambos suplementos, comparado com o grupo high-fat padrão ($p < 0.05$) (fig. 1G).

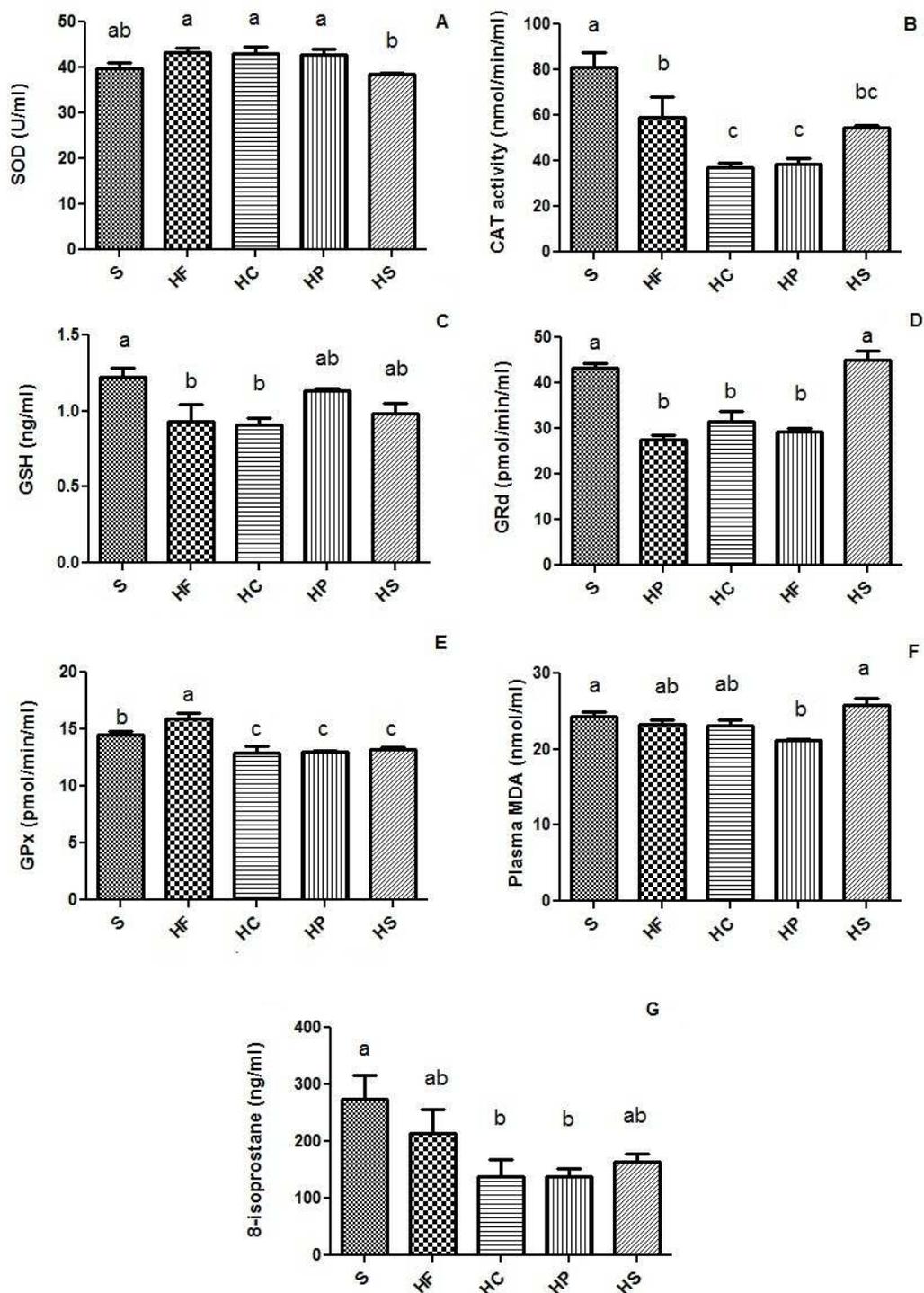


Figure 1. Perfil das enzimas antioxidantes e marcadores de oxidação lipídica no plasma de ratos *Sprague-Dawley* suplementados com dieta high-fat. (A) Superóxido desmutase. (B) Catalase. (C) Glutaciona (D) Glutaciona redutase. (E) Glutaciona Peroxidase. (F) Malondialdeído plasmático. (G) 8-F₂-Isoprostana.

3.2 Perfil hepático

Quanto ao peso do fígado os grupos suplementados com CLA, fitosterol e ambos apresentaram redução de peso significativo em relação ao grupo high-fat padrão ($p < 0.05$) (figura 2A). No entanto, quando verificado a quantidade de gordura hepática houve aumento apenas no grupo suplementado com fitosterol e redução de gordura no grupo suplementado com CLA mais fitosterol ($p < 0.05$) (figura 2B). O malondialdeído (MDA), produto secundário de peroxidação lipídica, não apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) entre os grupos suplementados em comparação com os grupos controles S e HF (figura 2D).

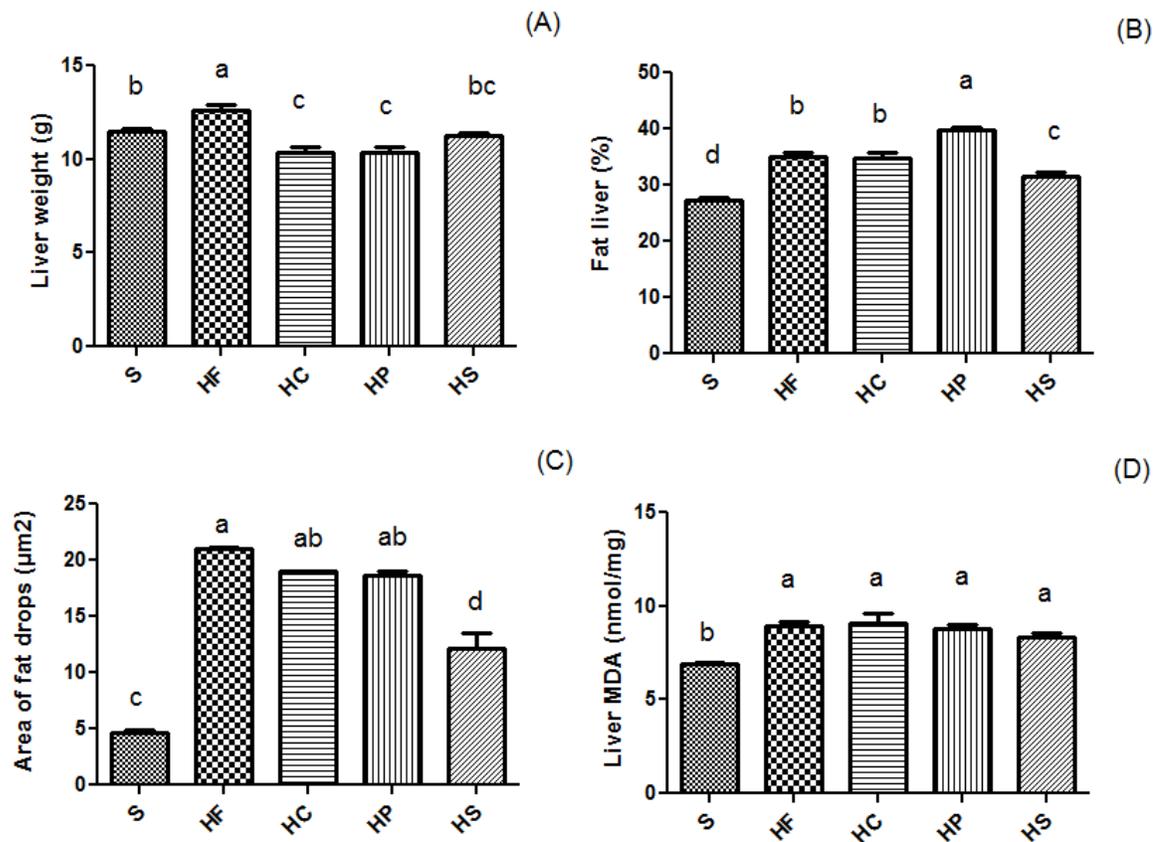


Figura 2. Características do fígado dos ratos *Sprague-Dawley*. (A) Peso do fígado. (B) Gordura hepática. (C) Área das gotículas de gordura. (D) MDA do fígado.

A área das gotas de gordura foram significativamente menores nos grupos suplementados ($p < 0.05$) (figura 2C). Por outro lado, ao visualizar as imagens histológicas fica claro, que o grupo que consumiu CLA apresentou gotas de gordura pequenas, porém em grande quantidade, em comparação com os demais grupos suplementados, que apresentaram um padrão de gotas de gordura maiores em comparação com o grupo High-fat padrão (figure 3).

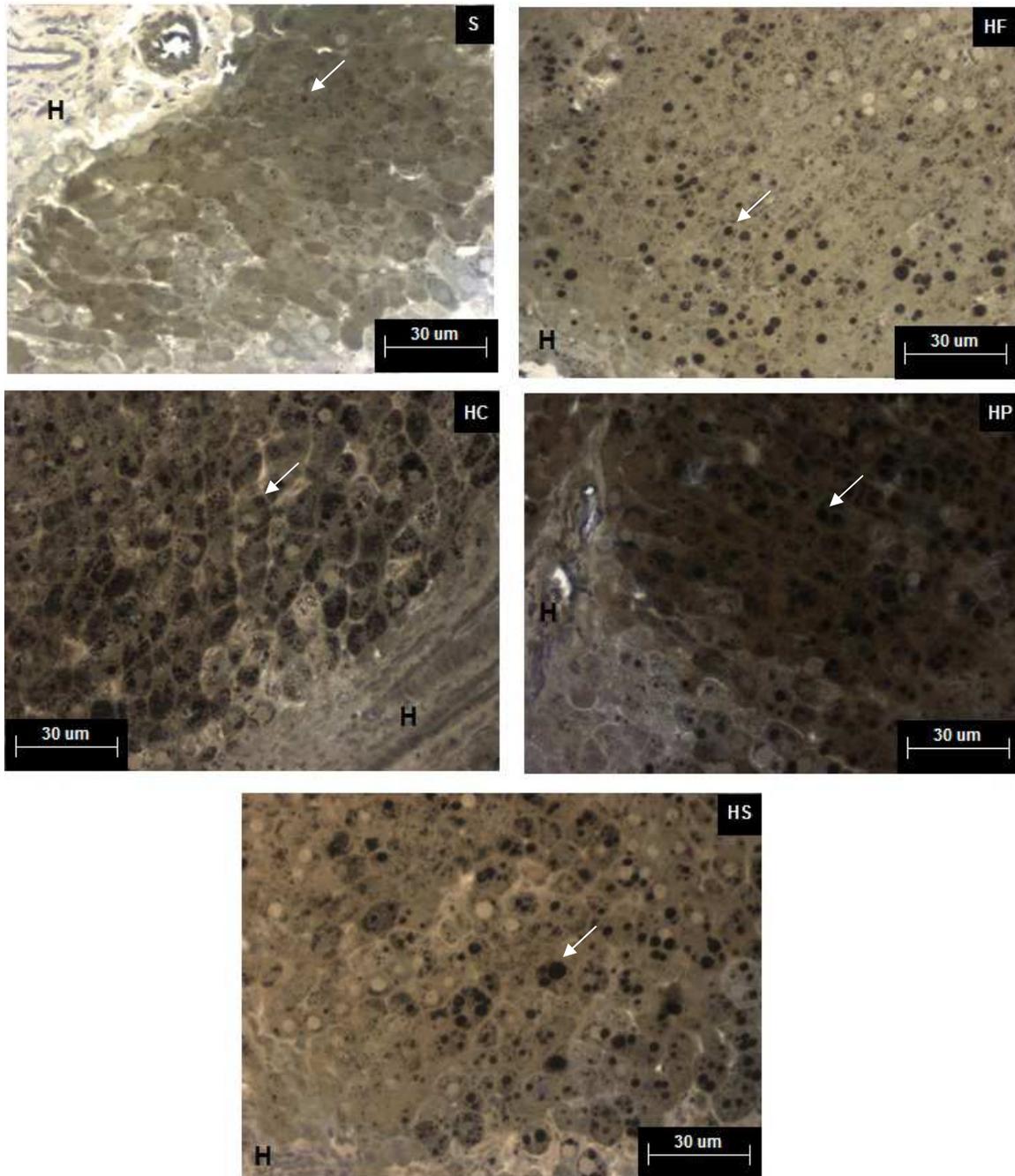


Figure 3. Efeito das dietas experimentais no fígado dos ratos. Tamanho da imagem: lente 20X. Esferas de gotículas de gordura estão em preto pela absorção do sulfato de ósmio. **H** = Sistema Porta-Hepático. **S** = (Grupo Padrão): dieta padrão AIN-93G + 2% óleo de canola. **HF** = (Grupo padrão High-fat): AIN-93G modificada: 35% de gordura: 4% de óleo vegetal (soja) e 31% de origem animal. **HC** = (Grupo dieta high-fat enriquecida) com 2% de ácido linoléico conjugado (Tonalin CLA®). **HP** = (Grupo dieta high-fat enriquecida) com 2% de fitosterol (Vegapure ®). **HS** = (Grupo dieta high-fat enriquecida) com 2% de ácido linoléico conjugado (Tonalin CLA ®) e 2% de fitosterol (Vegapure ®).

3.3 Ácidos graxos presentes no sangue

Houve redução dos ácidos graxos saturados palmítico, esteárico e araquídico nos grupos que receberam suplementação de CLA, quando comparado com o grupo padrão *high-fat* (HF) ($p < 0,05$). Todos os grupos suplementados com CLA e fitosterol aumentaram a quantidade de ácido graxos polinsaturados, principalmente os ácidos oléico e linoléico nos grupos suplementados com CLA e aumento do ácido 7Z,14Z-eicosadienóico nos grupos suplementados com fitosterol, quando comparados com o grupo HF ($p < 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos no soro dos ratos *Sprague-Dawley*.

		Standard^a	High-Fat^b	HC^c	HP^d	HS^e
		M ± DV	M ± DV	M ± DV	M ± DV	M ± DV
Ácidos Graxos Saturados						
C14:0	Ácido mirístico	3.04 ± 0.45 ^a	1.01 ± 0.18 ^d	1.28 ± 0.32 ^{cd}	1.82 ± 0.33 ^{bc}	2.27 ± 0.57 ^b
C16:0	Ácido palmítico	42.47 ± 4.75 ^a	23.03 ± 2.14 ^b	15.81 ± 1.89 ^c	22.66 ± 2.86 ^b	24.75 ± 1.33 ^b
C18:0	Ácido esteárico	4.97 ± 2.91 ^c	21.14 ± 4.40 ^a	10.52 ± 0.59 ^b	18.34 ± 5.06 ^a	6.95 ± 0.54 ^{bc}
C20:0	Ácido araquídico	19.01 ± 4.05 ^{abc}	20.56 ± 7.64 ^{ab}	12.40 ± 1.58 ^c	24.34 ± 7.64 ^a	16.26 ± 1.57 ^{bc}
C22:0	Ácido docosanóico	6.58 ± 3.82 ^{ab}	8.32 ± 3.51 ^a	1.97 ± 0.16 ^c	2.33 ± 0.33 ^c	3.14 ± 0.43 ^{bc}
Ácidos Graxos Polinsaturados						
C16:1-n3	Ácido 13-hexadecenoico	2.28 ± 0.43 ^a	0.81 ± 0.15 ^c	0.70 ± 0.06 ^c	1.34 ± 0.35 ^b	1.72 ± 0.19 ^b
C18:1-n9	Ácido oléico	8.16 ± 1.65 ^b	10.52 ± 4.74 ^b	17.65 ± 0.66 ^a	7.45 ± 1.26 ^b	10.54 ± 2.56 ^b
C18:2-n6	Ácido linoléico	6.84 ± 1.44 ^b	7.35 ± 7.09 ^b	20.30 ± 0.79 ^a	3.76 ± 1.23 ^b	2.18 ± 0.37 ^b
C20:2-n3	7Z,14Z- Ácido eicosadienóico	7.09 ± 4.20 ^b	0.03 ± 0.06 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	11.88 ± 2.03 ^a	9.14 ± 4.51 ^{ab}

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para teste de Tukey. (a) Grupo S (padrão): dieta AIN-93G padrão mais 2% de óleo de cártamo. (b) Grupo HF (*High-fat* padrão): AIN-93G modificada: 35% de gordura, 4% de óleo vegetal (soja) e 31% de origem animal (gordura suína). (c) Grupo HC (*High-fat* Experimental) dieta padrão rica em gordura enriquecida com 2% de ácido linoléico conjugado (CLA Tonalin®). (d) Grupo HP (*High-fat* Experimental) dieta padrão rica em gordura enriquecida com 2% de fitoesteróis (Vegapure®). (e) Grupo HS (*High-fat* Experimental) dieta padrão rica em gordura enriquecida com 2% de ácido linoleico conjugado (CLA Tonalin®) e 2% de fitosteróis (Vegapure®).

4. Discussão

Estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as enzimas antioxidantes, o que causa danos na estrutura e permeabilidade da membrana celular dos vasos sanguíneos e oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL)(Noeman, Hamooda, & Baalash, 2011). A peroxidação lipídica é quantificada pelos marcadores de dano lipídico como o MDA e a 8-F₂-isoprostana, sendo o segundo mais confiável como marcador de lipoperoxidação(Schneider, Silveira, Moreira, Belló-Klein, & Oliveira, 2009; Skenderi et al., 2008).

Apesar da correlação entre o aumento de lipoperoxidação com a inflamação, esteatose hepática não alcoólica e doenças cardiovasculares, isso não significa implicação causal. Em contraste, as isoprostanas e MDA plasmáticas estão aumentadas nessas condições, sendo possível determinar o início de uma doença por esses marcadores (Cracowski, Durand, & Bessard, 2002).

Por outro lado, 8-F₂-isoprostana para animais suplementados com CLA, não é o melhor indicador de oxidação lipídica. Sabe-se que ácidos graxos de cadeia longa, bem como o CLA, ativam os receptores nucleares PPAR- α , que são responsáveis pela regulação de enzimas do catabolismo de lipídios bem como as enzimas da mitocôndria e da β -oxidação dos peroxissomos (Rolo et al., 2012). Esse último, é responsável pelo catabolismo da 8-F₂-isoprostana, porém o CLA tem preferência na β -oxidação dos peroxissomos afetando o metabolismo da isoprostana (Iannone et al., 2009; Moya-Camarena, Heuvel, Blanchard, Leesnitzer, & Belury, 1999).

No presente estudo houve redução de MDA e 8-F₂-isoprostana nos grupos que receberam CLA e fitosterol, comparado com o grupo high-fat padrão (HF) (figura 1F e G). Estudos com humanos e com animais magros mostram redução da 8-F₂-isoprostana e de MDA plasmáticos quando suplementados com fitosterol (Mannarino et al., 2009; Marineli, Marques, Furlan, & Maróstica Jr, 2012) e aumento de 8-F₂-isoprostana plasmática quando suplementados com CLA (Basu, Smedman, & Vessby, 2000; Marineli et al., 2012; Stachowska et al., 2008). Porém, não há relatos na literatura da redução desses marcadores de lipoperoxidação, em modelo experimental induzido à obesidade por dieta rica em

lipídios. No entanto, a 8-F₂-isoprostana é um produto da catalização não enzimática do ácido araquidônico e, presente no plasma, é transportada pela LDL (Moore, 2004). Dessa forma, a redução da isoprostana, implica na redução do dano oxidativo e melhora do quadro inflamatório e aterosclerótico (Beutner et al., 2012) produzidos pelo CLA e pelo fitosterol.

Por outro lado, MDA é o maior produto secundário da peroxidação de ácido graxo polinsaturado bem como do ácido araquidônico (Dillioglulil et al., 2010). No presente estudo, houve maior concentração plasmática de ácidos graxos polinsaturados no grupo suplementado com CLA (HC) (tabela 1). No fígado, todos os animais que receberam dieta high-fat apresentaram aumento significativo de MDA e redução de MDA plasmático apenas no grupo suplementado com fitosterol. O aumento desse marcador está associado a efeitos mutagênicos e hepatotóxicos, e possivelmente com o início do processo aterosclerótico (Mateos, Lecumberri, Ramos, Goya, & Bravo, 2005). Dessa forma, por apresentar proteção dos danos causados pela lipoperoxidação, pela redução da 8-F₂-isoprostana e MDA, o fitosterol pode ser considerado um agente antioxidante (Marineli et al., 2012).

Em estudo com humanos, pacientes diabéticos e ateroscleróticos apresentaram maior MDA quando comparado com indivíduos saudáveis (Dierckx et al., 2003) (Tamer et al., 2002). Estudos clínicos e experimentais demonstram claramente, que pacientes e animais com esteatose hepática não alcoólica apresentam aumento de produtos da peroxidação lipídica (MDA), bem como alteração dos níveis das enzimas do sistema antioxidante no plasma (Patton et al., 2010) (Videla, Rodrigo, Araya, & Poniachik, 2004).

A redução do sistema antioxidante de defesa está relacionado com danos severos no fígado, principalmente pela redução das enzimas catalase, superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), e glutathione reductase (GRd) (Videla et al., 2004). Em nosso estudo, todos os grupos suplementados apresentaram redução dessas enzimas, além da redução da glutathione (GSH), não revertendo o quadro característico (Figura 1A-E).

Essa redução do sistema antioxidante de defesa, observado nos ratos *Sprague-Dawley*, está associada com a disfunção mitocondrial (Mailloux & Harper, 2012). O estresse oxidativo mitocondrial é causado principalmente pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, que ocorre durante uma supernutrição (causado neste caso pela dieta rica em lipídios) e sedentarismo. Esse dano mitocondrial está ligado de alguma forma à síndrome metabólica, porém os mecanismos e a significância ainda não foram completamente elucidados (James, Collins, Logan, & Murphy, 2012).

Em conjunto, a supernutrição está associada à esteatose hepática não alcoólica que ocorre pelo excesso de triglicérides. Ácidos graxos na corrente sanguínea ativam o PPAR α que aceleram o β -oxidação nos peroxissomos e na mitocôndria para conversão em Acetil-CoA (Lian, Niu, Kang, & Zhang, 2012). No entanto o excesso de triglicérides produz espécies reativas de oxigênio que são hepatotóxicas, prejudicam a função mitocondrial no fígado, geram o estresse oxidativo hepático (Romero-Sarmiento et al., 2012), o que contribui de forma direta para o desenvolvimento da obesidade, ganho de peso e resistência à insulina (Kusminski & Scherer, 2012).

Estudo anterior já havia demonstrado que o consumo de dieta high-fat causa desenvolvimento da obesidade e esteatose hepática (Cintra et al., 2008). Por outro lado, são dois caminhos que podem justificar a redução da esteatose hepática pelo CLA e pelo fitosterol. Quanto ao CLA, existem inúmeras hipóteses, ele pode agir de forma independente da ativação do PPAR α no fígado reduzindo a dinâmica da oxidação lipídica, ou ainda pode reduzir a lipogênese hepática por suprimir a atividade do fator de regulação da transcrição das enzimas da lipogênese (SREBP-1) (Noto et al., 2006).

Outro mecanismo, não se sabe ao certo se é devido à redução das partículas de gorduras causado pelo CLA por meio de outras vias, que resulta na redução da família das proteínas de gotículas de gordura (PERILIPIN-2) responsável pelo aumento ou diminuição dessas gotículas ou se o efeito anti-esteatótico do CLA pode ser resultado de uma possível alteração que o ele causa na expressão da família das proteínas de gotículas de gordura PERILIPIN (Stringer et al., 2010).

Já os fitosteróis, agem no aumento da expressão dos transportadores de membrana dependentes de ATP (ABCGs), principalmente ABCA1 e ABCG4 no intestino, que agem na conversão do receptor X agonista do fígado (LXR), que ativaria a expressão das proteínas ABCG5 e ABCG8 no fígado, que são responsáveis pelo efluxo de colesterol e fitosterol (Nabekura, Yamaki, Ueno, & Kitagawa, 2008). O receptor LXR tem função central no controle da transcrição do metabolismo de lipídios; uma vez ativado ele está envolvido na absorção do colesterol, efluxo, transporte e excreção. Além disso, os fitosteróis agem como ligantes das formas α e γ do receptor ativado por proliferadores de peroxissomo (PPAR), modificando a expressão dos genes envolvidos no transporte e oxidação de ácidos graxos e cetogênese no fígado dos animais. Também demonstrado na literatura, que a alteração gênica induzida pelo tratamento com os fitosteróis foi relacionada ao transporte de lipídios, à lipogênese, gliconeogênese e sinalização dos PPARs (Nomaguchi et al., 2011).

O segundo caminho é a redução dos ácidos graxos saturados circulantes proporcionados pelo CLA e pelo fitosterol. Resultado semelhante a outro estudo (Thijssen et al., 2005), o grupo que recebeu CLA apresentou redução de 31% do ácido graxo palmítico, e redução de 50% e 67% do ácido esteárico nos grupos suplementados com CLA e fitosterol respectivamente, em relação ao grupo high-fat padrão (tabela 1). A redução desses ácidos graxos ocorre por que o CLA (t-10, c-12) inibe a atividade da Δ -9 desaturase no fígado prejudicando a conversão dos ácidos esteárico e palmítico (Javadi et al., 2004), mas não há dados na literatura que explica a modulação pelo fitosterol. Por outro lado, o ácido graxo palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0) são classificados como indutores do processo inflamatório, pois são lipídios presentes na estrutura da membrana das bactérias patogênicas e nosso sistema imune às reconhece como agentes nocivos e o sistema inflamatório é ativado (Caroff & Karibian, 2003).

O fígado como órgão essencial no metabolismo de lipídios apresentou redução significativa da área dos glóbulos de gordura dos animais suplementados com CLA, fitosterol e ambos, quando comparado com o grupo high-fat padrão (figura 2C), porém não perto de voltar ao estado de normalidade quando comparado com o grupo padrão S. Apesar da área das gotas de gordura serem menor nos grupos suplementados a quantidade de gordura no fígado esteve reduzida significativamente no grupo que recebeu ambos

suplementos. Ao passo que o peso do fígado dos ratos que receberam os suplementos foi inferior ou igual ao grupo controle padrão (S) (figura 2A). Estes resultados vão de encontro com estudos anteriores que verificaram o peso do fígado pós suplementação de CLA (Park & Pariza, 2007; Romero-Sarmiento et al., 2012). Não há relatos anteriores do peso do órgão e histologia para animais suplementados com fitosterol, porém este apresentou resultados mais promissores e possíveis de maior investigação. Em soma, houve aumento de ácidos graxos poliinsaturados em todos os grupos suplementados (tabela 1). Esses ácidos graxos estão relacionados com a melhora da esteatose hepática em ratos obesos (Sekiya et al., 2003) pela supressão da SREBP-1, que tem papel crucial na regulação na síntese de colesterol e no controle da transcrição e expressão de enzimas lipogênicas e na síntese *de novo* da lipogênese, dos triglicérides e dos ácidos graxos (Qin, Dalen, Gustafsson, & Nebb, 2009).

Em resumo, a suplementação de 2% de CLA e 2% de fitosterol ou ambos, reduziu as gorduras de gordura hepáticas. Apesar do CLA aumentar 8-F₂-isoprostana em outros estudos com animais alimentados com dieta padrão, em nossos animais com dieta high-fat, esse quadro foi revertido, podendo ser considerado, juntamente com o fitosterol possíveis antioxidantes. No entanto, as enzimas antioxidantes apresentaram-se reduzidas mostrando disfunção mitocondrial, que está associado ao possível desenvolvimento de outras comorbidades como câncer e citotoxicidade.

Referências

- Andreoli, M. F., Gonzalez, M. A., Martinelli, M. I., Mocchiutti, N. O., & Bernal, C. A. (2009). Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 25 (4), 445-452.
- Basu, S., Smedman, A., & Vessby, B. (2000). Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Letters*, 468 (1), 33-36.
- Beutner, F., Brendel, D., Teupser, D., Sass, K., Baber, R., Mueller, M., Ceglarek, U., & Thiery, J. (2012). Effect of everolimus on pre-existing atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice. *Atherosclerosis*, 222 (2), 337-343.
- Caroff, M., & Karibian, D. (2003). Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338 (23), 2431-2447.
- Cintra, D. E., Pauli, J. R., Araújo, E. P., Moraes, J. C., de Souza, C. T., Milanski, M., Morari, J., Gambero, A., Saad, M. J., & Velloso, L. A. (2008). Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology*, 48 (4), 628-637.
- Cracowski, J.-L., Durand, T., & Bessard, G. (2002). Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23 (8), 360-366.

- Dierckx, N., Horvath, G., van Gils, C., Vertommen, J., van de Vliet, J., de Leeuw, I., & Manuel-Keenoy, B. (2003). Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr*, *57* (8), 999-1008.
- Dilliogluligil, M. O., Kir, H. M., Demir, C., Ilbay, G., Sahin, D., Dilliogluligil, O., Bambal, G., Mekik, H., & Ates, N. (2010). Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. *Brain Research Bulletin*, *83* (6), 356-359.
- Ebine, N., Demonty, I., Jia, X., & Jones, P. J. H. (2006). Plant stanol ascorbate esters reduce body weight gain through decreased energy absorption in hamsters. *Int J Obes*, *30* (5), 751-757.
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, *29* (1), 415-445.
- Iannone, A., Petroni, A., Murru, E., Cordeddu, L., Carta, G., Melis, M. P., Bergamini, S., Casa, L. D., Cappiello, L., Carissimi, R., O'Shea, M., Bell, D., De Santis, E., & Banni, S. (2009). Impairment of 8-iso-PGF₂ALPHA isoprostane metabolism by dietary conjugated linoleic acid (CLA). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *80* (5-6), 279-287.
- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., & Okumura, T. (2005). Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *336* (1), 215-222.
- James, A. M., Collins, Y., Logan, A., & Murphy, M. P. (2012). Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *23* (9), 429-434.
- Javadi, M., Beynen, A. C., Hovenier, R., Lankhorst, A. E., Lemmens, A. G., Terpstra, A. H. M., & Geelen, M. J. H. (2004). Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *15* (11), 680-687.
- Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *23* (9), 435-443.
- Lian, K., Niu, L., Kang, W., & Zhang, P. (2012). Effects of a high fat diet on long-chain fatty acids composition in rats serum and liver. *Food Research International*, *45* (1), 283-286.
- Mailloux, R. J., & Harper, M.-E. (2012). Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *23* (9), 451-458.
- Mangou, A., Grammatikopoulou, M. G., Mirkopoulou, D., Sailer, N., Kotzamanidis, C., & Tsigga, M. (2012). Associations between diet quality, health status and diabetic complications in patients with type 2 diabetes and comorbid obesity. *Endocrinología y Nutrición*, *59* (2), 109-116.
- Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., Siepi, D., Mezzetti, A., Bertolini, S., Parillo, M., Fellin, R., Pujia, A., Averna, M., Nicolle, C., & Notarbartolo, A. (2009). Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, *19* (2), 84-90.
- Marineli, R. d. S., Marques, A. y. C., Furlan, C. P. B., & Maróstica Jr, M. R. (2012). Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague-Dawley rats. *Food Research International*, *49* (1), 487-493.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., & Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*, *827* (1), 76-82.
- Moore, K. (2004). Isoprostanes and the liver. *Chemistry and Physics of Lipids*, *128* (1-2), 125-133.
- Moya-Camarena, S. Y., Heuvel, J. P. V., Blanchard, S. G., Leesnitzer, L. A., & Belury, M. A. (1999). Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . *Journal of Lipid Research*, *40* (8), 1426-1433.

- Nabekura, T., Yamaki, T., Ueno, K., & Kitagawa, S. (2008). Effects of plant sterols on human multidrug transporters ABCB1 and ABCC1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369 (2), 363-368.
- Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & metabolic syndrome*, 3 (1), 17.
- Nomaguchi, K., Tanaka, M., Misawa, E., Yamada, M., Toida, T., Iwatsuki, K., Goto, T., & Kawada, T. (2011). Aloe vera phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*, 5 (3), e190-e201.
- Noto, A., Zahradka, P., Yurkova, N., Xie, X., Nitschmann, E., Ogborn, M., & Taylor, C. (2006). Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids*, 41 (2), 179-188.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95 (2), 351-358.
- Ostlund, R. E., Racette, S. B., Okeke, A., & Stenson, W. F. (2002). Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75 (6), 1000-1004.
- Park, Y., & Pariza, M. W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International*, 40 (3), 311-323.
- Patton, H. M., Yates, K., Unalp-Arida, A., Behling, C. A., Huang, T. T.-K., Rosenthal, P., Sanyal, A. J., Schwimmer, J. B., & Lavine, J. E. (2010). Association Between Metabolic Syndrome and Liver Histology Among Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*, 105 (9), 2093-2102.
- Qin, Y., Dalen, K. T., Gustafsson, J.-Å., & Nebb, H. I. (2009). Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α -SREBP-1c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791 (2), 140-147.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (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. *The Journal of Nutrition*, 123 (11), 1939-1951.
- Rolo, A. P., Teodoro, J. S., & Palmeira, C. M. (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 52 (1), 59-69.
- Romero-Sarmiento, Y., Soto-Rodríguez, I., Arzaba-Villalba, A., García, H. S., & Alexander-Aguilera, A. (2012). Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods*, 4 (1), 219-225.
- Santos-Zago, L., Botelho, A., & de Oliveira, A. (2007). Supplementation with Commercial Mixtures of Conjugated Linoleic Acid in Association with Vitamin E and the Process of Lipid Autoxidation in Rats. *Lipids*, 42 (9), 845-854.
- Schneider, C. D., Silveira, M. M., Moreira, J. C. F., Belló-Klein, A., & Oliveira, A. R. d. (2009). Efeito do exercício de ultrarresistência sobre parâmetros de estresse oxidativo. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 15, 89-92.
- Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J.-i., Yamada, N., & Shimano, H. (2003). Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*, 38 (6), 1529-1539.
- Skenderi, K. P., Tsironi, M., Lazaropoulou, C., Anastasiou, C. A., Matalas, A. L., Kanavaki, I., Thalmann, M., Goussetis, E., Papassotiriou, I., & Chrousos, G. P. (2008). Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *European Journal of Clinical Investigation*, 38 (3), 159-165.
- Stachowska, E., Bańkiewicz-Masiuk, M., Dziedziejko, V., Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Dołęgowska, B., Wiszniewska, B., Machaliński, B., & Chlubek, D.

- (2008). Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages. *Nutrition*, 24 (2), 187-199.
- Stringer, D. M., Zahradka, P., DeClercq, V. C., Ryz, N. R., Diakiw, R., Burr, L. L., Xie, X., & Taylor, C. G. (2010). Modulation of lipid droplet size and lipid droplet proteins by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid parallels improvements in hepatic steatosis in obese, insulin-resistant rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 (12), 1375-1385.
- Sun, B., & Karin, M. (2012). Obesity, inflammation, and liver cancer. *Journal of Hepatology*, 56 (3), 704-713.
- Tamer, L., Sucu, N., Polat, G., Ercan, B., Aytacoglu, B., Yücebilgiç, G., Ünlü, A., Dikmengil, M., & Atik, U. (2002). Decreased Serum Total Antioxidant Status and Erythrocyte-Reduced Glutathione Levels Are Associated with Increased Serum Malondialdehyde in Atherosclerotic Patients. *Archives of Medical Research*, 33 (3), 257-260.
- Thijssen, M., Malpuech-Brugère, C., Gregoire, S., Chardigny, J., Sébédio, J., & Mensink, R. (2005). Effects of specific CLA isomers on plasma fatty acid profile and expression of desaturases in humans. *Lipids*, 40 (2), 137-145.
- Videla, L. A., Rodrigo, R., Araya, J., & Poniachik, J. (2004). Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (9), 1499-1507.
- Vyas, D., Kadegowda, A. K. G., & Erdman, R. A. (2012). Dietary Conjugated Linoleic Acid and Hepatic Steatosis: Species-Specific Effects on Liver and Adipose Lipid Metabolism and Gene Expression. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.

CAPITULO 4

CLA E/OU FITOSTEROL, ADICIONADOS À DIETA HIEPRILIPÍDICA, ALTERAM COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CARÇA DE RATOS *SPRAGUE-DAWLEY*.

Artigo a ser submetido na Revista de Nutrição (PUC-Campinas).

Cibele Priscila Busch Furlan, Camilla Bertuzzo Veiga, Mário Roberto Maróstica Júnior

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Caixa
Postal 6121, 13083-862, Campinas-SP, Brasil.

Resumo

A modulação da composição corporal tem sido atribuída à diversos componentes dos alimentos dentre eles o ácido linoléico conjugado (CLA) e fitosteróis, porém com resultados contraditórios. Nós investigamos o efeito da ingestão da suplementação do CLA e/ou fitosteróis na composição corporal de ratos *Sprague-Dawley* machos. Quarenta ratos *Sprague-Dawley* foram divididos em cinco grupos (n=8) aleatoriamente: grupo padrão, grupo padrão high-fat, e três grupos que receberam dieta padrão *high-fat* experimental com adição de 2% de CLA, outra com adição de 2% fitosteróis e o ultimo com adição de 2% de CLA mais 2% fitosteróis. As análises de umidade, proteína total e cinzas estão sendo realizadas segundo os métodos 930.15, 942.05 e 954.01, respectivamente, descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC,1995). Os lipídios totais foram determinados por Bligh; Dyer (1959). Os grupos que receberam suplementação de fitoesterol e CLA mais fitoesterol mostraram redução de gordura corporal de 19% e 11% respectivamente comparado com o grupo padrão high-fat ($p<0.05$), porém o grupo que recebeu apenas CLA apresentou redução de 7% de gordura corporal em comparação com o grupos padrão high-fat ($p<0.05$). Os suplementos adicionados na dieta high-fat, CLA e fitoesterol, apresentaram efeitos positivos na redução da gordura corporal total, bem como na manutenção da massa magra dos animais experimentais. No entanto, o fitosterol foi mais eficiente que o CLA na redução de gordura corporal e preservação de massa magra.

Palavras chave: CLA, fitosteról, composição corporal, redução de massa gorda.

Abstract

Modulation of body composition has been attributed the several food components among them conjugated linoleic acid (CLA) and phytosterols with contradictory findings. We investigated the effect of dietary CLA and/or phytosterols supplementation in corporal composition of *Sprague-Dawley* rats male. Forty *Sprague-Dawley* rats were divided into five groups (n=8) randomly: standad group, high-fat standad group, and three groups that received the standard experimental *high-fat* diet with addition of 2% CLA, with addition of 2% phytosterol and with addition of 2% CLA plus 2% phytosterols. Analyses of moisture, total protein and ash are being performed according to methods 930.15, 942.05 and 954.01, respectively, described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Total lipids were determined by Bligh, Dyer (1959). The groups supplemented with phytosterol and phytosterol plus CLA reduced body fat of 19% and 11%, respectively, compared to the standard high-fat group ($p < 0.05$), but the group that received only CLA decreased by 7% body fat compared with standard high-fat groups ($p < 0.05$). Supplements added to the high-fat diet, CLA and phytosterol showed positive effects in the reduction of total body fat and lean body mass maintenance of experimental animals. However, the phytosterol was more efficient than the CLA in reducing body fat and preserving lean body mass.

Key words: CLA, phytosterol, body composition, reduction of fat mass.

1. introdução

Atualmente é reconhecida a importância de se compreender o efeito dos nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos mesmo em pequenas concentrações e como estes podem atuar na presença de doenças, principalmente àquelas diretamente relacionadas à ingestão alimentar (MEAD, 2007).

Algumas das pesquisas já realizadas com ácido linoléico conjugado (CLA) determinaram seu poder de alterar a composição corporal, propiciando um aumento da massa magra e diminuição da massa gorda, de modo a agir ainda sobre a lipogênese (SANTOS-ZAGO *et al.*, 2009).

Compostos esteroidais das plantas, fitosteróis, são estruturas químicas similares ao colesterol, sendo considerados compostos funcionais, pois são responsáveis pela redução do LDL colesterol e do colesterol circulante devido à diminuição da absorção do colesterol exógeno e do colesterol biliar (ABUMWEIS; JONES, 2008).

O CLA age sobre a lipogênese e modula o processo de autoxidação lipídica de modo a inibir os danos causados pelos radicais hidroxila nas membranas celulares, que tem relação direta com o desenvolvimento de diversos processos patológicos, podendo funcionar, portanto, como um antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Já o fitosterol, pela redução da absorção de colesterol, diminuiu a ocorrência de LDL oxidada circulante, que produz lisofosfatidilcolina e esteróis oxidados, que ativam os macrófagos e células dendríticas a produzirem espécies reativas de oxigênio (MOORE; TABAS, 2011). A combinação do CLA mais fitosterol na dieta melhora o efeito antioxidante e reduz a peroxidação lipídica e ainda protege contra possíveis efeitos adversos da suplementação com CLA no estresse oxidativo *in vivo* (MARINELLI *et al.*, 2012).

2. Objetivo

Avaliar as alterações na composição corporal de ratos *Sprague-Dawley* alimentados com CLA e/ou fitosteróis.

3. Material e métodos

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados os equipamentos e instalações do Laboratório de Nutrição e Metabolismo e Laboratório de Lipídios do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

3.1 Ensaio Biológico

3.1.1 Os animais

O ensaio biológico foi composto por cinco grupos de oito ratos *Sprague-Dawley*, machos, recém desmamados (21 dias), provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). O experimento foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/UNICAMP) (Permissão nº 2417-1) e seguiu os termos éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com água e alimentação sob o sistema de livre acesso e permaneceram em ambiente com temperatura e umidade do ar controlada, em uma faixa de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e 60-70% respectivamente, e sob ciclo claro/escuro de 12 horas, durante todo o experimento. Os ratos permaneceram por 7 dias em aclimação às condições do ensaio, já recebendo as dietas experimentais.

3.1.2 Desenho Experimental e Dietas

Foram administradas duas dietas controle: uma dieta padrão, elaborada conforme o *American Institute of Nutrition* (REEVES et al, 1993), AIN-93G, com concentração de proteína bruta de 12% e normolipídica (GOENA et al., 1989); e uma dieta AIN-93G modificada hiperlipídica, com 12% de proteína e 35% (em massa) de lipídeos, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja) e 31% de origem animal (gordura suína) (CINTRA, 2008). Foram utilizados 2% da mistura dos isômeros de CLA *trans*-10,*cis*-12 (*t*-10,*c*-12) e CLA *cis*-9,*trans*-11 (*c*-9, *t*-11) e 2% de fitosteróis, ns dietas experimentais *high-fat*. Todas as dietas apresentaram em sua composição 2% de óleo de cártamo para igualar a energia.

A distribuição dos grupos experimentais é apresentada a seguir:

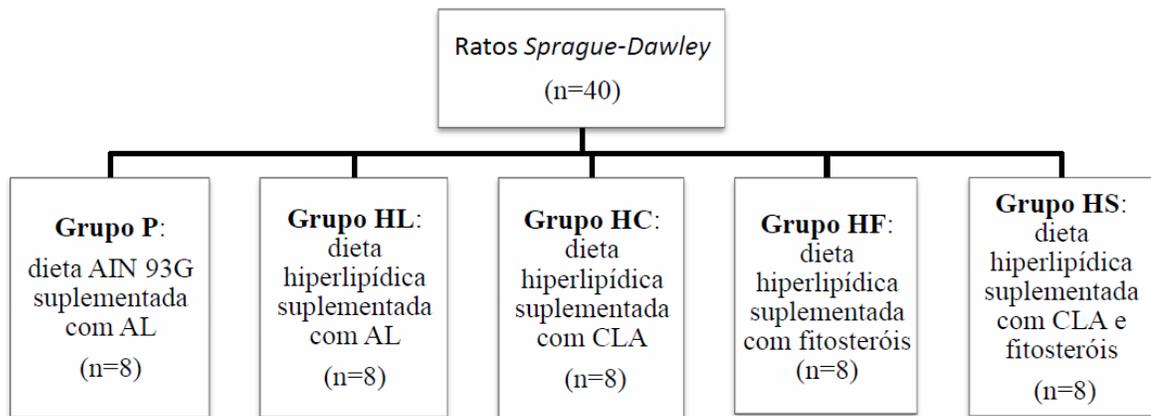


Figura 1. Desenho experimental do ensaio biológico.

3.1.3 Procedimento de preparo da carcaça dos animais experimentais

A avaliação da composição corporal total foi feita segundo Park et al. (1997), removendo-se o conteúdo intestinal para a obtenção da carcaça cheia. Posteriormente, a carcaça foi congelada, cordada em postas, liofilizada, triturada (no liquidificador e moinho), de modo a se obter material homogêneo (em forma de pó), e armazenada a -80°C (Figura 2) até o momento das determinações de umidade, cinzas totais, nitrogênio total (proteína) e de gordura total.



Figura 2. Fluxograma de preparo da carcaça. Da esquerda para a direita: postas da carcaça liofilizada, seguido do corte, tritura no liquidificador e moinho até ser obtido um material homogêneo.

3.1.4 Determinações da carcaça dos animais experimentais

As análises de umidade, proteína total e cinzas estão sendo realizadas segundo os métodos 930.15, 942.05 e 954.01, respectivamente, descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC,1995). Os lipídios totais foram determinados por Bligh; Dyer (1959).

3.1.5 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de *Tukey*, com alfa de 0,05, para os dados paramétricos, e para dados não paramétricos foram utilizados testes de Kruskal-Wallis.

4. Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados de proteína, lipídio, umidades, sólidos totais e cinzas obtidos nesse experimento. Observa-se que os grupos suplementados com 2% de CLA (HC) e o grupo que recebeu 2% CLA mais 2% de fitoesterol (HS) apresentam preservação de massa magra com quantidade de 10% e 9% de proteína, respectivamente quando em comparação com o grupo padrão high-fat (HP) ($p < 0.05$). O grupo que recebeu fitoesterol apresentou maior preservação de massa magra com 29% de proteína na carcaça comparado com o grupo parão high-fat.

Os grupos que receberam suplementação de fitoesterol e CLA mais fitoesterol mostraram redução de gordura corporal de 19% e 11% respectivamente comparado com o grupo padrão high-fat ($p < 0.05$), porém o grupo que recebeu apenas CLA apresentou redução de 7% de gordura corporal em comparação com o grupos padrão high-fat ($p < 0.05$).

Umidade, sólidos e cinzas totais não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

Tabela 1. Valores médios \pm desvio-padrão da composição corporal dos animais experimentais suplementados com CLA e fitosteróis.

Grupos	P ^a (n = 8)	HP ^b (n = 8)	HC ^c (n = 8)	HF ^d (n = 8)	HS ^e (n = 8)
Proteína Bruta (%)	47,22 \pm 6,00 ^{ab}	42,84 \pm 4,90 ^b	47,04 \pm 3,62 ^{ab}	55,50 \pm 4,92 ^a	46,72 \pm 1,77 ^{ab}
Lipídio (%)	41,43 \pm 6,23 ^{ab}	46,90 \pm 1,19 ^b	43,68 \pm 3,37 ^{ab}	38,13 \pm 4,43 ^a	41,69 \pm 3,13 ^{ab}
Umidade (%)	3,07 \pm 0,58 ^a	2,63 \pm 0,22 ^a	2,65 \pm 0,32 ^a	2,81 \pm 0,41 ^a	3,21 \pm 0,43 ^a
Sólidos Totais (%)	96,97 \pm 0,57 ^a	97,47 \pm 0,30 ^a	97,30 \pm 0,35 ^a	96,99 \pm 0,47 ^a	96,79 \pm 0,43 ^a
Cinzas (%)	7,25 \pm 0,65 ^a	6,48 \pm 0,59 ^a	6,97 \pm 1,00 ^a	6,91 \pm 0,75 ^a	6,75 \pm 0,47 ^a

Valores com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao teste de Tukey.

(a) Grupo P (Padrão): dieta padrão AIN-93G + 2% em relação ao consumo diário de dieta de óleo de cártamo.

(b) Grupo HP (High-fat padrão): dieta AIN-93G modificada, 35% de lipídios, sendo 4% de origem vegetal (óleo de soja) e 31% de origem animal (gordura suína).

(c) Grupo HC (High-fat Enriquecido Experimental): dieta high-fat padrão enriquecida com 2% de ácido linoléico conjugado (CLA *Tonalin*®).

(d) Grupo HF (High-fat Enriquecido Experimental): dieta high-fat padrão enriquecida com 2% de fitosteróis (*Vegapure*®).

(e) Grupo HS (High-fat Enriquecido Experimental): dieta high-fat padrão enriquecida com 2% de ácido linoléico conjugado (CLA *Tonalin*®) e 2% de fitosteróis (*Vegapure*®).

5. Discussão

A dieta suplementada com CLA promoveu a redução de gordura corporal e preservação de massa magra. Segundo Koba et al (2004), o CLA provoca a diminuição de atividade da lipase lipoproteica e aumento da lipólise nos adipócitos, além do aumento moderado na oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo, músculo e fígado.

Botelho et al. (2005) mostraram também redução de gordura corporal nos animais experimentais que receberam suplementação com CLA. O autor explica que, possivelmente, a diminuição da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos foi causada pela inibição do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), aumento do gasto energético, alteração da atividade das enzimas carnitina palmitoiltransferase e lipase lipoproteica, além da concentração de leptina. Portanto, tais mecanismos levam ao decrescente consumo alimentar nos animais experimentais reduzindo conseqüentemente o ganho de peso corporal.

Sugere-se que o CLA afeta a composição corporal por redução de massa gorda, por reduzir a absorção de lipídios pelas células adiposas devido a efeito sobre a lipoproteína lípase dessaturase, além da atividade da carnitina palmitoil em células musculares, enzima que atua limitando a oxidação, que é aumentada pelo CLA (KAMPHUIS, et al. 2003). Dessa forma, tais mecanismos estão diretamente relacionados com os efeitos observados no presente estudo, sobre a mobilização de gordura e composição corporal após suplementação com CLA (KAMPHUIS, et al. 2003).

No entanto, Zambell et al.(2001) e Kamphuis et al. (2003) não encontraram efeito do CLA (3 g/dia, por 9 semanas e de 3,4g de CLA, por 12 semanas respectivamente) sobre o peso corporal de ratos. Em contraponto, Erdman et al.(2012) mostrou que a alteração lipídica da composição centesimal da carcaça é dependente direta de algumas variantes como a quantidade de CLA adicionada à dieta, tempo de alimentação, condição fisiológica e espécie do animal experimental. Dessa forma, pode-se encontrar na literatur diferentes resultados quanto a composição.

Porém vale ressaltar que a gordura mobilizada não é totalmente metabolizada e sim armazenada no fígado do animal, podendo originar doenças, entre elas potencialmente esteatose hepática como observado no estudo apresentado por Vyas, et al. (2012). Os

fatores que levam ao acúmulo de lipídios no fígado envolvem o influxo de ácidos graxos, assim como aumento da síntese e oxidação alterada dos mesmos. A secreção de triacilglicerol é insuficiente para evitar o acúmulo lipídico. Desse modo, ocorre uma lipodistrofia no tecido adiposo, que é provocada pelo acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e nível reduzido de adipocinas, dessa maneira levando a níveis altos de circulação de ácidos graxos livres (CHARLTON et al., 2002).

O CLA promove, portanto, esse aumento no conteúdo lipídico hepático, que esta totalmente associado a lipogênese hepática. O CLA é um ligante natural da PPAR- γ , que por sua vez é uma proteína que leva ao aumento da captação hepática de ácidos graxos (BELURY et al., 2002). Na esteatose hepática, 59% de triacilglicerol é derivado de ácidos graxos livres liberados a partir do tecido adiposo e 15% é derivado da gordura da dieta. Os transportadores de ácidos graxos regulam a absorção pelo hepatócito e a superexpressão desses transportadores levam a esteatose (DONNELLY et al., 2005). Outro fator que auxilia ao surgimento da esteatose hepática é a exacerbada produção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) em resposta a alta concentração lipídica, porém a insuficiente e/ou deficiente exportação de gordura através da VLDL predispõem à patologia hepática (RASOOLY et al., 2007).

Altos níveis dietéticos de CLA também podem desenvolver outras complicações como resistência a insulina. Pois altas concentrações de CLA ativam os genes glicogênicos (PEPCK, G6P) que por sua vez levam a hiperglicemia. As altas concentrações de glicose no sangue aumentam a lipogênese hepática através do carboidrato e da proteína, que são elementos de resposta da ligação de um regulador da transcrição modulada pela glicose (DENECHAUD et al., 2007).

Foi observado neste presente estudo que o fitosterol apresentou poder redutor de gordura corporal maior que o do CLA. Ebine et al. (2006) mostrou também que animais suplementados com fitoesterol não só apresentaram 1,4% a menos de gordura em 5 semanas em comparação com o grupo controle, como apresentaram diminuição de colesterol circulante e benefício quanto às concentrações de triglicérides plasmático e hepático. Bem como demonstrado no estudo de Misawa et al (2012), onde houve diminuição e modulação das taxas de gordura corporal em ratos Zukers suplementados com dois tipos diferentes de fitoesterol de Aloe Vera.

O fitoesterol estimula o catabolismo da glicose e suprime a produção de nova glicose pela diminuição da expressão de uma enzima PDK4, que inibe a produção de acetil-CoA a partir da catalisação de piruvato no complexo piruvato desidrogenase o que melhora também a sensibilidade à inulina, e reduz a expressão de enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos (acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase (FAS)) (MISAWA et al., 2012).

Evidências científicas apontam que o fitosterol afeta ainda a absorção do colesterol no lumen intestinal, pois suas estruturas químicas são semelhantes. Assim, quando juntos no lumen intestinal, o fitosterol, por ser mais hidrofóbico, fica retido na estrutura micelar, enquanto que o colesterol, que não foi degradado em éster de colesterol, acaba perdendo seu lugar na estrutura micelar e por não ser absorvido é eliminado pelas fezes (SANCLEMENTE, 2009) o que pode estar associado à diminuição do peso corporal devido a menor absorção de energia no trato intestinal e diminuição do apetite dos animais. Estes são fatos que levam o fitoesterol a atuar na diminuição do peso corporal, sendo assim, essa substância pode ser um novo composto a ser utilizado no auxílio do tratamento contra a obesidade (EBINE et al., 2006).

6. Conclusão

Os suplementos adicionados na dieta high-fat, CLA e fitoesterol, apresentaram efeitos positivos na redução da gordura corporal total, bem como na manutenção da massa magra dos animais experimentais. No entanto, o fitosterol foi mais eficiente que o CLA na redução de gordura corporal e preservação de massa magra podendo ser explicado pela atuação desse composto em diferentes mecanismos celulares, além da barreira intestinal contra o colesterol exógeno.

Condições adversas como danos hepáticos e mecanismos de ação mais completos precisam ainda ser estudados para assegurar o uso do fitoesterol como suplemento auxiliador no tratamento da obesidade.

Referências

ABUMWEIS, S.; JONES, P. H. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 10, n. 6, p. 467-472, 2008/12/01 2008. ISSN 1523-3804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-008-0073-4> >.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC.** . Association of Official Analytical Chemists International. Virginia 1995.

BELURY, M. A. et al. Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ). **Nutrition Research**, v. 22, n. 7, p. 817-824, 2002. ISSN 0271-5317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531702003937> >.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959/08/01 1959. ISSN 0576-5544. Disponível em: < <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o59-099> >.

BOTELHO, A. P. et al. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 561-565, 2005. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732005000400011&nrm=iso >.

CINTRA, D. E. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 4, p. 628-637, 2008. ISSN 0168-8278. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827808000111> >.

CHARLTON, M. et al. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 898-904, 2002. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.32527> >.

DENECHAUD P. D., BOSSARD P., LOBACCARO J. M., et al. LXR stimulates ChREBP expression but glucose is required its post-translational activation. **Diabetes**, v. 56, p. A39, 2007.

DONNELLY, K. L. et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1343-1351, 2005. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.jci.org/articles/view/23621> >.

EBINE, N. et al. Plant stanol ascorbate esters reduce body weight gain through decreased energy absorption in hamsters. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, p. 751 - 757, 2006. Disponível em: < doi:10.1038/sj.ijo.0803191 >.

- GOENA, M. et al. Effect of the raw legume Vicia ervilha on muscle and liver protein metabolism in growing rats. . **Revista española de fisiología** v. 45, p. 55-60, 1989.
- KAMPHUIS, M.M. et al. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. **International Journal of Obesity**, v. 27, p.840–847, 2003. Disponível em: < <http://www.nature.com/ijo/journal/v27/n7/full/0802304a.html>>.
- KOBA, K. et al. Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. **Lipids**, v. 37, n. 4, p. 343-350, 2002/04/01 2002. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-002-0901-7> >.
- MARINELLI, R. D. S. et al. Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 487-493, 2012. ISSN 0963-9969. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002657> >.
- MEAD, M.N. Nutrigenomics the genome-food interface. **Environmental Health Perspective**, v. 115, p.585-589, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2137135/> >.
- MISAWA, E. et al. Oral Ingestion of Aloe vera Phytosterols Alters Hepatic Gene Expression Profiles and Ameliorates Obesity-Associated Metabolic Disorders in Zucker Diabetic Fatty Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2799-2806, 2012/03/21 2012. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jf204465j> >. Acesso em: 2012/10/24.
- MOORE, KATHRYN J.; TABAS, I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 341-355, 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411004223> >.
- PARK, P. et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v. 32, p. 853 - 858, 1997. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11745-997-0109-x?LI=true>>.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, November 1, 1993 1993. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/123/11/1939.short> >.
- RASOOLY, R. et al. Dietary trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid reduces the expression of fatty acid oxidation and drug detoxification enzymes in mouse liver. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 01, p. 58-66, 2007. ISSN 1475-2662. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114507257745> >.

SANTOS-ZAGO, L. F.; BOTELHO, A. P.; OLIVEIRA, A. C. D. 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. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 39-49, 2009. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732009000100004&nrm=iso >.

SANTOS-ZAGO, L. F.; BOTELHO, A. P.; OLIVEIRA, A. C. D. Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 195-221, 2008. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732008000200008&nrm=iso >.

VYAS, D.; KADEGOWDA, A. K. G.; ERDMAN, R. A. Dietary Conjugated Linoleic Acid and Hepatic Steatosis: Species-Specific Effects on Liver and Adipose Lipid Metabolism and Gene Expression. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/932928> >.

ZAMBELL, K.; HORN, W.; KEIM, N. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on fatty acid and glycerol kinetics. **Lipids**, v. 36, n. 8, p. 767-772, 2001/08/01 2001. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-001-0783-8> >.

Conclusão geral

A suplementação de 2% de CLA e 2% de fitosterol e a combinação por 65 dias foi efetiva e reduziu gordura corporal, peso e consumo dos animais. Apenas o CLA pareceu modular a ação da leptina na obesidade. Ambos os suplementos não reduziram a resistência a insulina e intolerância a glicose induzidas pela dieta rica em gordura. No entanto, ambos os suplementos reduziram a área das gotas de gordura hepática. O CLA juntamente com o fitosterol podem ser considerados possíveis antioxidantes, pois modularam indicadores de lipoperoxidação. No entanto, as enzimas antioxidantes apresentaram-se reduzidas mostrando disfunção mitocondrial, que está associado ao possível desenvolvimento de outras comorbidades como câncer e citotoxicidade. Dessa forma, CLA e fitosterol são potentes compostos para melhorar complicações relacionadas à obesidade, tais como gordura hepática, porém mais estudos e mais protocolos precisam ser desenvolvidos na área de sinalização celular e polimorfismos genéticos para assegurar os benefícios desses suplementos à saúde.

Anexos

Anexo 1



UNICAMP



CEUA/Unicamp

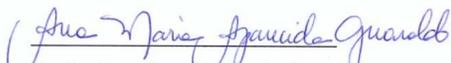
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

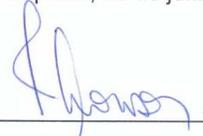
Certificamos que o projeto "O EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) E DOS FITOSTERÓIS NA PREVENÇÃO DA OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA UTILIZANDO MODELO EXPERIMENTAL" (protocolo nº 2417-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior / Cibele Priscila Buch Furlan, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de junho de 2011.

Campinas, 06 de junho de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 2

Tabela 1. Porcentagem de cada esteroide nas amostras dos suplementos utilizados no experimento referente aos dados do capítulo 2.

Esteróis	Soja	Fitosterol	Cartamo	CLA
	(%)	(%)	(%)	(%)
Colesterol	0,00	0,00	0,00	0,00
Brasicasterol	0,45	0,00	0,00	0,00
Campesterol	18,27	29,86	11,06	0,00
Campestanol	7,77	3,92	0,45	0,00
Estigmasterol	17,54	14,49	5,27	0,00
Delta 7-campesterol	0,37	0,18	0,00	0,00
Delta 5,23-estigmastadienol	0,63	0,34	4,93	0,00
Clerosterol	0,17	0,33	0,35	0,00
Beta sitosterol	48,87	46,60	48,69	0,00
Sitostanol	2,10	3,42	1,97	0,00
Delta 5-avenasterol	0,10	0,11	1,05	0,00
Delta 5,24-estigmastadienol	0,12	0,17	0,74	0,00
Delta 7-estigmastanol	2,83	0,29	24,46	0,00
Delta 7-avenasterol	0,51	0,29	1,02	0,00
TOTAL	100	100	100	0
Fitosteróis g/100g de óleo	10,00	53,98	25,50	0,00

Anexo 3

Email DA ELSEVIER AUTORIZANDO a publicação do artigo na dissertação

Hello Wendy!

Many thanks for your response!

Cibele, você pode usar o artigo na dissertação, desde que cite corretamente como no link.

Wendy, it is not sunny! Sao Paulo is only rain since Xmas and for us, cold for a summer!

Kind regards,

ANDERSON.

De: "Wendy Hurp (ELS-OXF)" <W.Hurp@elsevier.com>

Para: assantana@usp.br, "Rupal Malde (ELS-OXF)" <R.Malde@elsevier.com>

Cc: cibelefurlan07@gmail.com

Enviadas: Quinta-feira, 17 de Janeiro de 2013 9:14:41

Assunto: RE: Submission FRI - direito autoral

Hi Anderson,

Yes, it is permitted for authors to use their accepted papers in their thesis or dissertation, provided the paper is correctly cited. Here is further information on what is permissible:

<http://www.elsevier.com/authors/author-rights-and-responsibilities>

Hope it is warm and sunny in Brazil – it is freezing here!

Kind regards,

Wendy

From: Anderson de Souza Sant'Ana [mailto:assantana@usp.br]

Sent: 16 January 2013 12:41

To: Malde, Rupal (ELS-OXF); Hurp, Wendy (ELS-OXF)

Cc: cibelefurlan07@gmail.com

Subject: Re: Submission FRI - direito autoral

Dear Rupal and Wendy,

I hope this e-mail finds you well!

I am writing because an author here from Brazil wishes to present her recently FRI accepted paper in her master dissertation.

Is there any requirement or problem for Mrs Cibele to put the accepted paper as a chapter of her dissertation? If any, could you provide us with instructions?

Thanks and kind regards,

ANDERSON.