

CLA

OU

ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO

O ácido linoléico conjugado, em inglês *Conjugated Linoleic Acid*, ou CLA, refere-se a uma família composta por alguns isômeros do ácido linoléico. Encontram-se principalmente na carne e em produtos lácteos oriundos de ruminantes.

INTRODUÇÃO

Ácido linoléico conjugado (CLA) é o nome dado ao grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienóico (18:2). As duplas ligações no CLA são conjugadas e não separadas por um grupo metileno (-CH₂-), como no ácido linoléico (LA, 18:2n-6), um ácido graxo essencial. O CLA não substitui o LA como um ácido graxo essencial. Os isômeros do CLA ocorrem naturalmente em alimentos derivados de animais ruminantes (vaca, cordeiro, etc.), devido ao processo de biohidrogenação bacteriana do LA, que está presente nos alimentos destes animais, no rúmen. O CLA também é encontrado naturalmente em uma variedade de outros produtos alimentícios, não oriundos de animais ruminantes, tais como mariscos, perus e óleos vegetais.

As gorduras e as carnes de animais ruminantes são as mais ricas fontes naturais de isômeros do CLA. Esses isômeros são encontrados em miligra-

mas por grama de gordura nas carnes de cordeiro, vitela e gado. As maiores concentrações de CLA nos alimentos são encontradas em diversos produtos lácteos. Na maioria dos casos, o isômero *cis-9, trans-11*, ainda chamado de ácido rumênico, é o isômero predominante do CLA encontrado em alimentos, exceto nos óleos vegetais que podem conter vários outros isômeros. Estimativas de necessidade de ingestão de CLA variam de 0,3 a 1,5g/pessoa/dia, dependendo do sexo e da ingestão de alimentos de origem animal e vegetal.

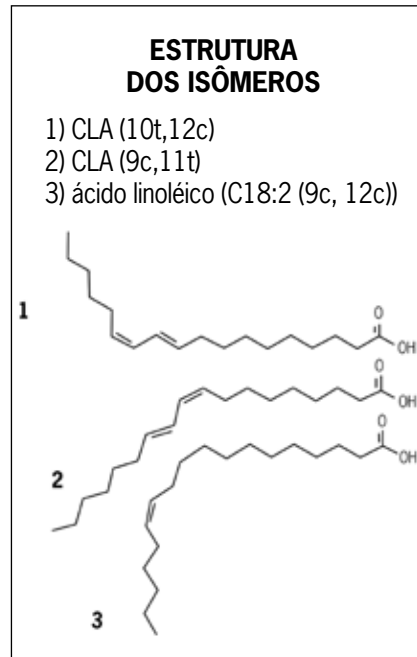
A presença de CLA em gorduras lácteas é conhecida há anos. A descoberta de que o CLA isolado da carne grelhada inibe o câncer quimicamente induzido chamou a atenção da comunidade científica e, por isso, passou-se a estudar suas propriedades físicas e biológicas. A ampla literatura sobre o CLA sugere que estes ácidos graxos isometricamente conjugados possuem potentes atividades bioquímicas e fisiológicas que podem beneficiar a saúde humana e proteger contra doenças crônicas.

QUÍMICA E NOMENCLATURA

A sigla CLA é usada para descrever uma família de isômeros do ácido octadecadienóico (18:2), que possui um par de ligações duplas conjugadas ao longo da cadeia alquila. Teoricamente, as ligações duplas podem existir em qualquer local dos carbonos C2 a C18, para produzir inúmeras estruturas possíveis de isômeros. Foram relatadas formas isoméricas de ácido octadecadienóico contendo ligações duplas conjugadas nas posições 7,9; 8,10; 9,11; 10,12; 11,13; e 12,14 (contando a partir do final carboxila da molécula), em misturas de CLA quimicamente preparadas ou em produtos naturais. Cada um dos referidos isômeros posicionais de dienos conjugados pode ocorrer em uma ou mais das quatro seguintes configurações geométricas: *cis-trans*; *trans-cis*; *cis-cis*; ou *trans-trans*, o que daria 24 possíveis isômeros de CLA. Muitos desses isômeros estão contidos em preparações comercialmente disponíveis de suplementos de CLA, produzidas sob condições alcalinas, a partir de óleos vegetais contendo alta concentração de LA (girassol e cártamo).

O isômero mais comum de CLA encontrado na carne de ruminantes e em produtos alimentícios de leite bovino é o ácido octadeca-c9, t11-dienóico. A presença de componentes secundários, como os isômeros t7, c9, t8, c10, t10, c12, t11, c13, e t12,t14, e seus isômeros *cis,cis*, *trans,trans*, também foram encontrados em produtos naturais. Dois nomes triviais foram propostos para o isômero c9,t11, ácido bovínico e ácido rumênico. O nome ácido bovínico foi considerado demasiado restritivo para o CLA, porque o isômero c9,t11 não é produzido somente no rúmen bovino, mas é produzido também por outros animais ruminantes pelo mesmo mecanismo. O nome ácido rumênico recebeu maior aceitação, sendo encontrado repetidas vezes na literatura técnica relativa ao assunto.

A ocorrência natural de CLA na carne de ruminantes e em laticínios



pode ser formada por isomerização bacteriana do LA e, possivelmente, ácido α -linolênico de grãos e plantas forrageiras para c9,t11 – 18:2 no rúmen desses animais. O CLA também pode ser formado durante o cozimento e processamento de alimentos. O pesquisador Yeong L. Há, do *Food Research Institute*, da *University of Wisconsin-Madison*, e seus colegas, mediram o teor de CLA em queijos processados e sugeriram que a formação do CLA é proveniente de uma oxidação por radicais livres do LA, que pode ter sido afetada pelo envelhecimento, tratamento térmico e/ou qualidade da proteína. Segundo esta hipótese, os radicais alila são produzidos a partir da oxidação do LA em lipídios de glicerol, incluindo fosfolipídios, durante o tratamento térmico em condições anaeróbias. O CLA é derivado após a estabilização dos radicais alila por reprotonação das proteínas, atuando como doadores de hidrogênio.

ALIMENTOS ENRIQUECIDOS COM CLA

Atualmente, o consumo humano estimado de CLA, pela dieta normal, não é suficiente para exercer o potencial benéfico bioquímico, mo-

lecular e fisiológico contra o câncer, aterosclerose e obesidade, com base em estudos com diversos animais. Estima-se, com base em estudo efetuado em ratos, que um homem com peso de 70 kg deve consumir 3,0g de CLA/dia para usufruir de seus efeitos benéficos. Portanto, os benefícios à saúde que o CLA pode promover só serão alcançados com a ingestão de complementos alimentares ou alterações na qualidade e tipo de alimentos ingeridos. Uma vez que os suplementos são menos apreciados do que os próprios alimentos como fonte de nutrientes, nutracêuticos e fitoquímicos, uma abordagem muito melhor seria o aumento da ingestão de CLA pelo enriquecimento de alimentos com CLA.

A primeira abordagem é, obviamente, consumir mais alimentos ricos em CLA. A segunda é aumentar o teor de CLA em ovos, leite e carnes de origem animal. É uma abordagem mais prática, uma vez que não depende de mudanças nas práticas alimentares e não irá elevar o consumo diário de colesterol e gordura saturada. Aumentar o teor de CLA de produtos alimentícios, como o leite e a carne, também tem potencial de aumentar o seu valor nutricional e terapêutico, e pode ter um peso mercadológico apreciável, acrescentando valor a produtos tradicionais.

O conteúdo de CLA nos alimentos é afetado por vários fatores, durante todas as fases, do campo até o seu consumo, incluindo a produção de matérias-primas, processamento, embalagem, armazenamento e preparo dos alimentos antes de servir. O teor original de CLA da matéria-prima é determinado no momento da coleta ou após um processamento mínimo. Embora o posterior processamento, armazenamento e preparo modifique um pouco o conteúdo de CLA, essa variação é relativamente pequena em comparação com a grande variação natural encontrada principalmente nos produtos lácteos. Vários fatores, tais como o tipo de alimentação (fator nutricional), estação do ano, variação genética, e fatores de gestão podem influenciar

TEOR DE CLA EM ALIMENTOS NÃO COZIDOS		
Alimento	Total de CLA (mg/g de gordura)	Isômero 9c, 11t (%)
Carnes		
Carne bovina moída	4,3	85
Lingüiça bovina defumada	3,8	84
Carne de vitela	2,7	84
Carne de cordeiro	5,6	92
Carne de porco	0,6	82
Aves domésticas		
Frango	0,9	84
Carne de peru moída	2,5	76
Frutos do mar		
Salmão	0,3	n.d.*
Truta	0,5	n.d.*
Camarão	0,6	n.d.*
Laticínios		
Leite homogeneizado	5,5	92
Manteiga	4,7	88
Coalhada	4,6	90
logurte natural	4,8	84
Sorvete	3,6	86
Queijo Cheddar	3,6	93
Queijo Mussarela	4,9	95
Queijo Cottage	4,5	83
Óleos vegetais		
Algodão	0,7	44
Girassol	0,4	38
Canola	0,5	44
Milho	0,2	39

* n.d. - não detectável. Fonte: (10).

na concentração de CLA na gordura de ruminantes, produtos cárneos e laticínios.

AÇÕES BIOLÓGICAS E OS POTENCIAIS BENEFÍCIOS À SAÚDE DO CLA

O CLA é o único antioxidante e anticarcinogênico associado a alimentos de origem animal. Yeong L. Há e sua equipe foram os primeiros a observar que o CLA da carne apresentava efeito protetor contra o câncer quimicamente induzido. Nesse estudo, o CLA isolado a partir de extratos de carne moída grelhada

reduziu os tumores de pele, em ratos com carcinogênese quimicamente induzida pelo 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), um conhecido agente cancerígeno. Desde então, diversos pesquisadores têm relatado os potenciais benefícios à saúde e os efeitos biológicos dos isômeros de CLA. As pesquisas sobre o CLA se basearam quase que inteiramente em modelos com animais e vários sistemas de cultura de células, empregando misturas de isômeros de CLA. As propriedades do CLA incluem efeitos anticarcinogênicos e antiateroscleróticos. Outros efeitos do CLA são sua ação antioxidante e imunomodulatória. Dados preliminares mais recentes sugerem que o

CLA também pode agir no controle da obesidade, na redução do risco de diabetes, e na modulação do metabolismo ósseo. Alguns estudos indicam que os efeitos biológicos do CLA são influenciados pela dieta e, particularmente, a ingestão de ácidos graxos n-3 de cadeia longa.

Intensas pesquisas têm sido realizadas para determinar as propriedades anticarcinogênicas do CLA. Foi observado que os isômeros do CLA reduzem a tumorigênese induzida quimicamente em glândula mamária e no cólon de ratos. Fontes de CLA também inibiram o crescimento das células tumorais humanas, em cultura e em imunodeficiência combinada severa (SCID).

O CLA E O CÂNCER

Experimentos em animais têm sistematicamente mostrado que o CLA promove benefícios para a saúde - anticarcinogênico, antiaterosclerótico, antidiabético -, melhoria do sistema imune e provoca aumento da massa muscular com diminuição da massa gordurosa. O CLA de ocorrência natural (9c,11t-18:2) está mais relacionado com a prevenção do câncer enquanto que o sintético (10c,12t-18:2) com as mudanças da composição corporal.

A pesquisadora francesa Anne de La Torre, em 2006, estudou as propriedades antitumorais das misturas de CLA provenientes de produtos originários dos ruminantes. Foram estudados os efeitos antiproliferativos *in vitro* de uma mistura de CLA originária da carne de boi, em culturas de células de câncer de mama, pulmão, cólon, melanoma e ovário. As células foram expostas a apenas 100 micromoles de CLA durante 48 horas e a proliferação foi determinada pelo conteúdo de DNA na cultura. Constatou-se redução da proliferação celular, variando de 25 a 67% dependendo da linhagem celular neoplásica. O efeito antiproliferativo variou com a posição e configuração das duplas ligações. O isômero do CLA mais potente foi o isômero natural (9c,11t-18:2). O autor concluiu

que as misturas de CLA derivadas da carne bovina inibem a proliferação celular de várias linhagens de câncer humano.

Câncer de cólon. Laticínios com elevado teor de gordura contêm quantidades razoáveis do agente anticarcinogênico CLA. Em estudo envolvendo 60.708 mulheres com idade variando entre 40 e 76 anos, verificou-se o consumo de laticínios com alto teor de gordura por meio de questionários e dosagens. No período de 15 anos diagnosticou-se 798 casos de câncer colo-retal. As mulheres que consumiam quatro ou mais porções de laticínios com alto teor de gordura (leite integral, manteiga, creme de leite, creme azedo, coalhada de leite integral) apresentaram risco significativamente menor deste câncer, quando comparadas com as mulheres que consumiam apenas uma porção destes produtos lácteos. Cada incremento de duas porções de produtos lácteos com alto teor de gordura corresponderam a 13% de redução do risco de câncer colo-retal. Os ácidos biliares funcionam como promotores do câncer de cólon, ativando a proteína com alto teor de gordura quinase C (PKC) e o fator de transcrição nuclear NF-κB. Pesquisadores do Montagu Hospital,

em Mexborough, UK, mostraram, em 2006, que o tratamento de longo prazo com CLA inibe a ativação da proteína quinase C (PKC) e a ativação do NF-κB provocada pelo ácido biliar mais importante, o ácido deoxicólico (DOA). O tratamento agudo não possui efeito. O CLA também previne o câncer de cólon por diminuir a expressão do gene APC-β-cateninaTCF-4 e por diminuir a sinalização do PPAR-δ.

NF-κB (fator nuclear kappa B) é um complexo protéico que desempenha funções como fator de transcrição. NF-κB pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvido na resposta celular a estímulos, como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antigénios virais e bacterianos. NF-κB desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infecção. Consistente com este papel, a regulação incorreta de NF-κB tem sido ligada ao cancro, a doenças inflamatórias e auto-imunes, choque séptico, infecção viral e também a desenvolvimento imunitário impróprio. NF-κB também tem sido implicado em processos de plasticidade sináptica e memória.

O NAG-1 (*Non-steroidal Anti-inflammatory drug-activated Gene-1*) pode ser induzido por vários componentes da dieta e pertence à superfamília dos TGF-β, genes associados com a atividade antitumoral e com a apoptose. O isômero sintético do CLA é capaz de induzir a expressão do gene antitumoral NAG-1 em células do câncer colo-retal. O isômero natural do CLA não apresenta este efeito.

O CLA reduziu a incidência de tumor de cólon em rato provocado pelo carcinógeno químico dime-tilhidrazina (DMH). Estudos *in vitro* mostraram que o isômero sintético (10t,12c) inibe a proliferação de células do câncer de cólon humano HT-29 e Caco-2, enquanto que o isômero natural (9c,11t) não possui nenhum efeito. O tratamento das células do câncer de cólon humano com o isômero sintético aumentou substancialmente a expressão protéica e o acúmulo de RNA mensageiro do CDK inibidor p21 (CIP1/WAF1) e diminuiu a fosforilação da proteína retinoblastoma, fatores que provocaram a parada do ciclo celular na fase G1. Não houve mudanças da ciclina A, ciclina D, ciclina E e das CDK2 e CDK4, ciclinas dependentes da quinase 2 e 4.

A proliferação de células MKN28 do câncer gástrico humano e células Colo320 do câncer de cólon humano foram suprimidas pelo CLA de uma maneira dose-dependente e observou-se aumento da apoptose. O CLA inibiu significativamente a invasão da membrana coberta por colágeno tipo IV destes dois tipos de células malignas, firmando seu papel como antimetastático. O tratamento com CLA diminuiu significativamente os focos de metástases e aumentou a sobrevivência dos camundongos inoculados com estes dois tipos de tumores. Deste experimento concluiu-se que o CLA inibe metástases de câncer gástrico e de câncer de cólon.

O isômero sintético, mas não o natural, inibe a síntese de DNA e induz apoptose em células HT-29 do câncer de cólon humano. Tal isômero diminui os níveis de Erb1, Erb2 e Erb3 de uma maneira dose-dependente



A ampla literatura sobre o CLA sugere que estes ácidos graxos isometricamente conjugados possuem potentes atividades bioquímicas e fisiológicas que podem beneficiar a saúde humana e proteger contra doenças crônicas.



Estima-se, com base em estudos efetuados em ratos, que um homem com peso de 70 kg deve consumir 3,0g de CLA/dia para usufruir de seus efeitos benéficos. Portanto, os benefícios à saúde que o CLA pode promover só serão alcançados com a ingestão de complementos alimentares ou alterações na qualidade e tipo de alimentos ingeridos.

o que leva a inibição da ativação da via Akt. A via Akt é proliferativa. O PPAR- γ possui atividade anti-neoplásica e sua ativação reduz a inflamação do epitélio, diminuindo o risco de câncer de cólon. A sua ativação pelos CLAs naturais ou sintéticos induz muitas linhagens de células cancerosas humanas a se diferenciarem, isto é, o fenótipo maligno reverte para fenótipo normal.

Câncer de mama. Enquanto o ácido linoléico (LA) exerce diferentes efeitos na carcinogênese, indo da inibição a neutro ou mesmo promovendo a proliferação, o CLA sempre mostra efeitos inibitórios sobre a proliferação celular maligna em todas as linhagens de células cancerosas humanas testadas (cólon, mama, próstata, fígado, bexiga, glioblastoma) e ele é particularmente eficaz contra as células mais malignas. No câncer de mama é o contrário, quanto mais maligno menor é o seu efeito. O mecanismo de ação principal do CLA em todas essas linhagens de células foi aumentar muito o PPAR- α e diminuir o PPAR- β/δ , o que provoca apoptose ou necrose das células

malignas. Quando o PPAR- γ diminuiu houve drástica queda da proliferação celular maligna.

Robert T. Dauchy, pesquisador chefe e diretor do laboratório de oncologia crono-neuroendócrina do *Bassett Healthcare Institute*, em Cooperstown, NY, relatou, em 2006, que os agentes anticâncer, melatonina, ácido eicosapentaenóico (EPA) e o CLA inibem a proliferação de vários tumores animais, suprimindo a captação tumoral de ácido linoléico, principal ácido graxo promotor da proliferação celular maligna, e diminuindo a produção do agente mitótico ácido 13-hidroxi-octadecadienóico (13-HODE). Usando um elegante modelo de perfusão de tumor de mama humano (MCF-7) implantado em camundongo, o autor mostrou que a captação de ácido linoléico pelo tumor era de 1,06+/-0,28 microgramas/min/g e que a produção de 13-HODE era de 1,38+/-0,02 nanogramas/min/g de tecido tumoral. Tanto a captação de ácido linoléico como a produção de 13-HODE caiu a zero em 5 minutos de perfusão quando se utilizou em separado cada um dos agentes, me-

latonina, EPA ou CLA.

Em células do câncer de mama não responsivo a estrógenos (MDA-MB-231) o CLA provocou redução da proliferação celular com acúmulo de células na fase S do ciclo celular e apoptose. Verificou-se redução da ERK1/2 e aumento da proteína pró-apoptótica Bak. Estes eventos se associaram com a diminuição dos níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2(L), à translocação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma e da clivagem da pró-caspase-9 e da pró-caspase-3, todos fatores envolvidos com a via mitocondrial de apoptose.

Em células do câncer de mama humano responsivas aos estrógenos (MCF-7 ER+) o CLA possui uma atividade antiestrogênica direta. O CLA *9cis,11cis* e, com menor efeito, o *9cis,11trans*, diminui a expressão do ER α a nível de RNA mensageiro e de proteína. Células MCF-7 do câncer de mama humano foram submetidas a concentrações crescentes do isômero natural do CLA: 25, 50, 100 e 200 micromole/l e o autor observou inibições também crescentes da proliferação celular, respectivamente: 6%, 45%, 99% e 99,4%. Também houve aumento crescente da apoptose. As células MCF-7 normalmente apresentam diminuição da expressão da proteína p53. Quando foram submetidas ao CLA houve drástico aumento da proteína p53 que é pró-apoptótica.

Sabe-se que o CLA protege as mulheres do câncer de mama. O CLA inibe a proliferação de células MCF-7 do câncer de mama de um modo concentração dependente e tempo dependente. O CLA diminui a produção de Raf-1 e assim diminui os níveis de fosfo-ERK1/2 (ERK1/2 i.e. *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*), diminui a expressão do c-mic e aumenta a expressão do PP2A (*Protein Phosphatase 2A*). Neste processo a PP2A participa na desativação ou diminuição da atividade do ERK1/2, sendo este um novo mecanismo de ação do CLA como antiproliferativo. O aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) é um dos fatores

que inicia a formação de tumores de mama. Células MCF-7 do tumor de mama humano tratadas com CLA apresentam atenuação da transcrição da COX-2 induzida por agentes inflamatórios, via redução da ativação do AP-1 (*Activator Protein-1*). O isômero sintético é mais eficaz do que o natural. O ácido linoléico provoca efeitos inversos, isto é, ele aumenta a ativação do AP-1 e, conseqüentemente, acentua a transcrição da COX-2 e aumenta a produção do tumor de mama. O ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico (5-HETE) é derivado da via lipoxigenase das prostaglandinas e está implicado na carcinogênese mamária. Os CLAs, tanto o sintético como o natural, reduzem a produção de 5-HETE em células MDA-MB-231 do câncer de mama humano. A proteína tirosina fosfatase gama (*PTPγ*) é conhecida como um gene supressor de tumores de pulmão e de rim. O estradiol induz a supressão do PTPγ e pode provocar o aparecimento de tumores de mama. Estudando tecido mamário retirado de neoplasias ou de cirurgias plásticas, observou-se que a expressão do PTPγ é menor no tecido com câncer do que no tecido mamário normal. Os dois principais isômeros do CLA aumentam significativamente os níveis do RNAm do PTPγ em células do estroma normais e em células malignas epiteliais, porém não em células malignas do estroma. O isômero sintético é o mais ativo.

O VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*) é um fator promotor da neoangiogênese ativada por cininas. Em células MCF-7 do estroma do câncer de mama humano, o CLA diminuiu significativamente o RNAm do VEGF-A e os seus níveis de proteínas, isto é, diminuiu a expressão do VEGF-A. O autor concluiu que o CLA da dieta (produtos de ruminantes e laticínios) serve como agente quimiopreventivo no câncer de mama humano, diminuindo a expressão de agente promotor da neoangiogênese maligna, o VEGF-A

Na fase de proliferação, o estres-

se oxidativo dobra a incorporação do CLA nas células do adenocarcinoma mamário (MCF-7) e reduz a incorporação nas células mamárias normais. O CLA provoca nas células tumorais o aumento da expressão do 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), produto da lipoperoxidação e diminui a proliferação das células malignas. A diminuição da proliferação induzida pelo CLA coincide com o aumento da ativação da proteína p53, agente pró-apoptótico. Pode ser que o aumento da p53 observado seja secundário ao estresse oxidativo.

Ratos com câncer de mama alimentados com manteiga rica em 9c,11t-CLA por 4 semanas apresentaram redução da expressão das ciclinas D e A do epitélio mamário, que são proteínas-chaves envolvidas, a primeira, na facilitação da entrada das células no ciclo celular, e a segunda, na progressão para a fase S de síntese de DNA. O CLA também afeta outras ciclinas e as CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) do ciclo celular.

Câncer de próstata. Em células do câncer de próstata LNCap, o CLA natural, mas não o sintético, aumenta significativamente a apoptose provocada pelo TNF- α o que se correlaciona com a redução da atividade transcripcional do NF- κ B (35%), a diminuição da atividade ligadora do NF- κ B (15%) e a diminuição da fosforilação do I- κ B- α (36%). Outro mecanismo do CLA aumentando a apoptose e diminuindo a proliferação do câncer de próstata é aumentando a proteína quinase- δ (PKC- δ) e diminuindo a PKC- ζ . Foi mostrado em células PC-3 do câncer de próstata humano que o CLA diminui a expressão do gene Bel-2 e aumenta o inibidor do ciclo celular, p21(WAF1/Cip1). O isômero sintético é o mais potente provocando 55% da inibição proliferativa.

Câncer de cérebro. O CLA modula o metabolismo lipídico através da ativação dos receptores do PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*). A família dos PPAR é

constituída por 3 genes intimamente relacionados, PPAR alfa, beta/delta e gama. A ativação do PPAR-gama provoca inibição da proliferação celular e a diferenciação de células transformadas.

O glioblastoma multiforme, tumor freqüente do cérebro, é pouco sensível à quimioterapia. Sabe-se que o CLA e os agonistas do PPAR-gama inibem fortemente o crescimento celular e a velocidade de proliferação tumoral e induzem apoptose. Ademais, os dois elementos diminuem a migração celular e a invasividade tumoral. Demonstrou-se que o CLA, direta ou indiretamente, funciona como agonista do PPAR-gama, sugerindo que este ácido graxo possa ser usado no tratamento dos tumores cerebrais como coadjuvante do tratamento convencional ou para diminuir as recorrências.

Como conclusão pode-se dizer que muitos estudos em animais e *in vitro* revelam o valor do CLA como potente agente antiproliferativo e apoptótico em todas as linhagens de células tumorais humanas que foram testadas. Os diferentes tipos de mecanismos de ação mostram que o CLA, por ser muito versátil, em breve poderá se constituir em importante droga coadjuvante no tratamento do câncer humano.

CLA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Os benefícios potenciais para a saúde do CLA incluem a prevenção de doenças cardiovasculares congestivas, uma vez que foi mostrado que estes isômeros de ácidos graxos reduzem a aterogênese, em estudos com animais. Esses estudos avaliaram o efeito do CLA sobre a aterosclerose em coelhos, que receberam uma suplementação de 0,5g/animal/dia durante 22 semanas. Comparado com os coelhos do grupo controle, que receberam uma dieta semelhante contendo 14% de gordura e 0,1% de colesterol, sem CLA, o colesterol total e LDL, bem como os níveis de triglicérides no sangue foram significativamente inferiores nos coelhos

que receberam a suplementação com CLA. Ao mesmo tempo, as relações LDL/HDL e colesterol total/HDL foram significativamente reduzidos no grupo que recebeu CLA. Os coelhos que receberam CLA também mostraram menos aterosclerose na aorta.

Em outro estudo, examinou-se os efeitos do CLA sobre as lipoproteínas plasmáticas e aterosclerose da aorta. No estudo, 50 hamsters foram distribuídos em cinco grupos de 10 e receberam 0% (controle), 0,06% (baixo), 0,11% (médio) e 1,1% (alto) da dieta total de CLA, ou 1,1% da dieta total de LA. Animais que receberam a dieta contendo CLA tiveram significativa redução dos níveis de colesterol plasmático total, colesterol não-HDL (combinado com lipoproteínas de baixa densidade ou VLDL e LDL) e triacilgliceróis, com nenhum efeito sobre o colesterol HDL, quando comparados com os controles. A análise morfológica da aorta revelou um aparecimento mais tardio de aterosclerose nos hamsters que tiveram suplementação com CLA, em comparação ao grupo controle. Curiosamente, nesse estudo, o tratamento com LA mostrou um efeito semelhante em comparação com o tratamento com CLA. Esses dois estudos levaram à conclusão que o CLA tinha efeito hipocolesterolêmico e antiaterogênico. No entanto, um estudo recente com camundongos C57BL/6, utilizando dietas aterogênicas com adição de 0,5% e 0,25% CLA, mostrou aumento do desenvolvimento de estrias gordurosas na aorta, apesar de uma mudança do perfil das lipoproteínas séricas, que poderia ser considerada menos aterogênico.

Embora seja evidente que o CLA exerce efeitos benéficos à saúde em animais na melhora do metabolismo plasmático de lipoproteínas e na prevenção de aterosclerose, não há informações suficientes sobre seus efeitos em humanos, tornando difícil prever os efeitos da suplementação com CLA em longo prazo. Além disso, os estudos com CLA em humanos são difíceis de interpretar porque

utilizam diferentes parâmetros de medição e há variação nas dosagens, duração da administração e características individuais dos objetos de estudo (idade, grau de obesidade, padrões de dieta, nível de atividade física). A suplementação com isômeros de CLA pode apresentar benefícios ou riscos à saúde humana, portanto mais estudos controlados, usando isômeros de CLA, precisam ser realizados para determinar sua segurança e eficácia, antes de serem recomendados. Além disso, o CLA mostrou ter efeito positivo sobre a aterosclerose em coelhos, mas não em camundongos, o que pode indicar uma diferença de espécies para a resposta à suplementação de CLA na dieta.

O CLA E O METABOLISMO DA GORDURA CORPORAL E DE LIPÍDIOS

Numerosos estudos com animais sugerem que o CLA pode reduzir a deposição de gordura e o aumento da massa corporal magra. Quando foi dado CLA (0,5% a 1% da dieta) a ratos do sexo masculino AKR/J (com 39 dias de idade), houve uma rápida e acentuada diminuição da acumulação de gordura e um aumento no acúmulo de proteínas, sem maiores efeitos sobre o consumo alimentar. Em outro estudo, foi dada uma dieta com menor nível de CLA (5% de óleo de milho + 0,5% de CLA) para camundongos de seis semanas, do tipo ICR; observou-se uma redução significativa no conteúdo de gordura corporal de 57% (machos) e 60% (fêmeas), bem como aumento da massa magra, em relação aos ratos do grupo controle que somente receberam 5,5% de óleo de milho. Efeitos similares foram observados também em ratos.

O reparticionamento de gordura para massa magra também foi observado em suínos em crescimento. Porém, os estudos em humanos

não indicaram a mesma eficiência obtida em animais. Veja o exemplo do estudo publicado por Blankson et. al. em dezembro de 2000, no qual, os autores analisaram o efeito do CLA na redução da gordura em seres humanos obesos, usando para avaliação corporal o *Dual-Energy X-ray Absorptiometry* (DEXA). Depois de 12 semanas o grupo que utilizou CLA (3,4 g/d) teve uma redução significativa da gordura corporal, comparado com o grupo placebo, porém não relataram alterações na massa corporal magra. Nesse estudo, o CLA se mostrou eficiente para reduzir a gordura corporal em seres humanos obesos. Os resultados pareciam prometedores, porém a amostra era relativamente pequena e isto, em ciência, pode ser considerado um fator limitante em conclusões gerais.

Os efeitos do CLA em seres humanos com obesidade abdominal foram investigados durante quatro semanas, no qual 24 homens obesos com síndrome metabólica fizeram parte da amostra. Catorze deles receberam 4,2 g CLA/d e 10 receberam placebo. Ao término do estudo verificou-se uma significativa redução no perímetro abdominal com a suplementação de CLA, porém outras medidas antropométricas não mostraram nenhuma diferença significativa entre os grupos. Os resultados indicaram que a suplementação de CLA por 4 semanas em homens obesos com síndrome metabólica pode diminuir a gordura abdominal. Mas por que será que as outras medidas não diminuíram?

Já em indivíduos de peso normal que se exercitavam regularmente o CLA não se mostrou eficaz na redução da gordura corporal. Novamente, Blankson et. al. (2000) analisou 66 indivíduos obesos (com IMC acima de 25-35 kg/m²) divididos em cinco grupos: 1) placebo (9g de óleo de oliva), 2) 1,7g de CLA, 3) 3.4g de CLA, 4) 5.1g de CLA e 5) 6.8 g de CLA. Ao final de 12 semanas, todos os grupos que receberam CLA apresentaram redução significativa do percentual de gordura, em

comparação com o grupo placebo e dentre os grupos que receberam CLA a redução da gordura corporal foi significativamente maior nos grupos que receberam 3,4 e 6,8 gramas por dia, sugerindo que doses diárias acima de 3,4 gramas de CLA são desnecessárias.

Acredita-se que a suplementação com CLA promova modificações na membrana do tecido adiposo, alterando assim a expressão gênica do adipócito, através da diminuição da atividade da enzima stearyl-CoA desaturase. Outra hipótese é que os efeitos do CLA sobre a composição corporal podem estar relacionados à redução do tecido adiposo pelo aumento da lipólise. Os melhores resultados em humanos na diminuição da gordura corporal aconteceram naqueles que tinham deficiência de CLA no organismo, como por exemplo pessoas vegetarianas. Os obesos também conseguiram melhores resultados no uso do ácido linoléico conjugado na redução da gordura corporal.

“No Brasil, a ANVISA, no dia 29/03/2007, publicou a resolução RE nº 833 que determina a apreensão de todos os lotes do produto Ácido Linoléico Conjugado (CLA). Nenhuma empresa no Brasil tem autorização da ANVISA para fabricar, importar ou comercializar esse produto.

O ácido linoléico conjugado tem sido vendido para praticantes de atividade física com alegações de que o produto auxilia na queima de gordura e no aumento de massa muscular. No entanto, ainda não existem dados que confirmem essas indicações.

MECANISMOS DE AÇÃO DO CLA

À medida que as pesquisas sobre o CLA se desenvolvem, vários modos de ação são propostos. Os isômeros de CLA têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes, inibir a formação de DNA carcinógeno, induzir a apoptose, modular a composição de ácidos graxos

dos tecidos e no metabolismo de eicosanóides, e afetar a expressão e a ação de citocinas e fatores de crescimento. Já que a maioria dos estudos mencionados acima foram conduzidos com misturas de diversos isômeros de CLA (principalmente *c9,t11-18:2* e *t10,c12-18:2*), os mecanismos de ação propostos podem ser específicos.

Ação antioxidante. Antioxidantes provenientes tanto de fontes naturais como sintéticas, com estruturas diversas apresentam alguma atividade anticarcinogênica. Uma vez que o CLA possui ação antioxidativa, pode ser um importante mecanismo para o efeito anticarcinogênico do CLA. Diversos estudos têm sido realizados, utilizando sistemas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, para esclarecer o papel do CLA como um antioxidante, no entanto, os resultados obtidos a partir de diferentes sistemas de testes são conflitantes.

Em estudo *in vitro*, foi mostrado que o CLA é um potente antioxidante. Em uma concentração muito baixa de 0,375 μmol , o CLA inibe a formação de peróxido em mais

de 90%, em uma mistura reagente composta por 375 μmol de LA, 10ml de 0,2 M de fosfato tampão (pH 8), 4,5ml de água, e 10,5ml de etanol. O CLA mostrou ser um antioxidante mais potente do que o α -tocoferol e comparável ao butil-hidroxitolueno, em condições de ensaio. Curiosamente, neste estudo, uma maior concentração de CLA não aumentou a eficácia, mas teve um efeito antioxidativo reduzido, em concentração de 37,5 μmol .

Um estudo *in vivo*, mostrou que o CLA foi tão eficaz como a vitamina E em inibir a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na glândula mamária, mas não no fígado. Todas as doses testadas produziram uma inibição de 30% a 40% na formação de peróxido, ou seja, não foi dose-dependente.

Em outro estudo, ratos fêmeas receberam dietas contendo diferentes tipos de lipídios (20% de óleo de milho ou banha) ou quantidades de uma mistura de gordura (de 10% a 20% do peso), com ou sem 1% de CLA. Os resultados mostram que o CLA reduziu o malondialdeído (produto da peroxidação), produzido

Embora seja evidente que o CLA exerce efeitos benéficos à saúde em animais na melhora do metabolismo plasmático de lipoproteínas e na prevenção de aterosclerose, não há informações suficientes sobre seus efeitos em humanos, tornando difícil prever os efeitos da suplementação com CLA em longo prazo.





O ácido linoléico conjugado tem sido vendido para praticantes de atividade física com alegações de que o produto auxilia na queima de gordura e no aumento de massa muscular. No entanto, ainda não existem dados

que confirmem essas indicações.

na glândula mamária de ratos, com maior redução em ratos alimentados com alto teor de PUFA (35% de óleo de milho), do que nos ratos que receberam dieta com gordura altamente saturada (25% de banha). No entanto, o CLA não demonstrou qualquer efeito inibitório no nível de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG, um marcador de dano oxidativo ao DNA). Embora o CLA mostre-se um antioxidante em estudos *in vitro* e *in vivo*, o efeito anticancerígeno do CLA nesses estudos não pode ser explicado satisfatoriamente com base nesta constatação. Primeiro, a concentração máxima de CLA em inibir a formação de peróxido não está de acordo com a concentração mais eficaz na inibição do tumor. Em segundo lugar, nenhum dos estudos demonstraram uma relação dose-dependente entre a concentração de CLA e sua eficácia antioxidante, a que geralmente ocorre para os nutrientes antioxidantes estudados até agora.

Outra pesquisa foi realizada sobre a propriedade antioxidante do CLA, usando um sistema de membrana lipídica constituída por

1-Palmitoil-2-linoleoil fosfatidilcolina. Os resultados deste estudo indicam que o CLA não demonstrou qualquer efeito protetor nas condições de ensaio e foi mais suscetível a danos oxidativos do que o LA; foi comparável com o ácido araquidônico. De acordo com as conclusões de pesquisas anteriores, um recente estudo mostrou também que o CLA é mais propenso a oxidação do que o LA; nenhum efeito antioxidante significativo de CLA foi detectado nos modelos testados. Aparentemente, o CLA e seus metabólitos se comportam como ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), em condições de estresse oxidativo.

Em contraste com as propriedades antioxidantes do CLA, os resultados de experimentos utilizando células de câncer humano, sugeriram que o CLA, devido à sua suscetibilidade a danos oxidativos, pode se comportar como um pró-oxidante em sistemas de cultura celular. Além disso, o CLA pode criar um ambiente de estresse oxidativo, que é citotóxico para as células cultivadas. Em experimento foi utilizado CLA dissolvido em etanol, adicionado

a uma cultura de células humanas (células de câncer de mama MCF-7 e células de câncer de cólon SW-480), nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20 e 30ppm, incubadas por 4, 8 e 12 dias. O tratamento com 20ppm de CLA aumentou a peroxidação lipídica e induziu a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em ambas as células. Na concentração de 20ppm de CLA também reduziu a incorporação de H-leucina na proteína em 83% a 91%, a incorporação de H-uridina e H-timidina em DNA e RNA em 49% a 91% e 86 a 98%, respectivamente, em comparação com as células controle não tratadas. Aparentemente, pelo menos em parte, o sistema enzimático antioxidante induzido falhou em proteger as células da citotoxicidade peroxidativa. O efeito controverso do CLA como um antioxidante ou pró-oxidante, parece ir de encontro ao conhecimento prévio de que o equilíbrio entre atividades antioxidantes e pró-oxidantes é uma função complexa, dependente da concentração e da pressão parcial de oxigênio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde a identificação do CLA, as pesquisas têm enfatizado a sua propriedade anticarcinogênica. Todavia, no final da década de 90, houve uma alteração nas linhas de pesquisas sobre este composto, relacionando-o com a estimulação da ação de insulina, redução de gordura corporal, redução de leptina sérica, modulação do sistema imune e diminuição de colesterol sérico.

Embora o CLA seja associado a muitos potenciais efeitos benéficos, alguns estudos têm demonstrado a existência de efeitos colaterais em modelos animais, como diminuição de marcadores biológicos que atuam na formação óssea e diminuição nos níveis de HDL. Por outro lado, outras pesquisas têm revelado ausência de toxicidade do CLA, classificando-o como substância segura (GRAS).

Portanto, novos estudos são necessários para investigar os efeitos e mecanismos de ação do CLA sobre o metabolismo humano.

Até que ponto a suplementação com CLA pode ser utilizada sem riscos à saúde? Essa é uma pergunta difícil de responder devido à escassez de estudos sobre o consumo de suplemento de CLA durante longos períodos de tempo. A maioria dos estudos apresenta tempos de suplementação relativamente curtos, com média de quatro a seis semanas, de forma que são raros os estudos com meses de duração. Existem evidências em animais e, mesmo que controversas e um tanto quanto escassas, em humanos de que o CLA promove efeitos benéficos em curto prazo, mas a grande questão é a seguinte: esses efeitos se prolongam por quanto tempo? E os efeitos adversos do consumo de CLA em longo prazo?

Alguns pesquisadores tentaram responder essas perguntas planejando ensaios cujo tempo de suplementação com CLA foram considerados longos. Os pesquisadores Jean-Michel Gaullier (*Conjugated linoleic acid supplementation for one year reduces body fat mass in healthy overweight humans*), Leah D. Whigham (*Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans*) e Thomas Meinert Larsen (*Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain*) suplementaram indivíduos de ambos os sexos, com sobrepeso e/ou obesidade, com concentrações que variaram entre 3,4g/dia e 6g/dia durante um ano. De acordo com o protocolo experimental desses estudos, nenhum efeito adverso sobre o metabolismo de lipídios e glicose foi observado nos indivíduos. No entanto, no estudo de Jean-Michel Gaullier, 68% dos participantes relataram 264 eventos adversos, entre os quais 30 foram considerados pelos pesquisadores relacionados com o CLA. Desconforto, dores abdominais e dispepsia foram o efeitos mais relatados. Leah D. Whigham e cole-

gas, embora não tenham observado nenhum efeito adverso, não recomendam o consumo de suplemento de CLA por mulheres grávidas ou em período de lactação, para evitar alterações quantitativas e qualitativas no leite. Diferentemente de Gaullier e Whigham, Thomas Meinert Larsen e colegas avaliaram também o efeito da suplementação em longo prazo com CLA na recuperação do peso e da gordura corporal perdidos, e chegaram à conclusão de que o CLA não previne essa recuperação, pois os indivíduos apresentaram recuperação de 4,0kg (Desvio padrão – DP = 5,6) e 2,1kg (DP = 5,0) de peso e gordura corporal, respectivamente, a qual não foi diferente do grupo placebo. Recentemente, Gaullier e colegas publicaram os resultados da continuidade de seu trabalho anterior (*Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans*). O estudo mais recente foi conduzido por mais 12 meses (com cerca de 70% dos indivíduos do estudo inicial) completando um período total de 24 meses de suplementação com CLA, caracterizando o período mais longo de suplementação da história das pesquisas com CLA. Os autores, além de concluir que a suplementação com misturas de isômeros de CLA reduziu significativamente a gordura e o peso corporal e que esta redução não teve relação com a dieta ou exercício, também concluem que a suplementação foi segura, visto que as alterações observadas estão dentro do normal.

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

efeitos adversos, parece ser uma alternativa viável.

Este grupo de pesquisa nos últimos três anos tem demonstrado que este composto é capaz de reduzir significativamente a gordura corporal, além de promover aumento do conteúdo de minerais em ratos, o que pode indicar aumento da mineralização óssea. A influência do CLA sobre o processo de antioxidação dos lipídios biológicos também tem sido identificada nestas pesquisas. Dependendo do indicador biológico utilizado para avaliar este processo, os resultados têm demonstrado que o CLA pode funcionar como um antioxidante e, conseqüentemente, atuar como coadjuvante na prevenção e no controle de inúmeras doenças relacionadas com estresse oxidativo. Por outro lado, sendo o CLA um dieno conjugado, o aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo não está descartado, como observado em alguns indicadores determinados nos experimentos dos autores deste trabalho, que tiveram seus valores aumentados após suplementação com CLA. As perspectivas daqui em diante são de aprofundamento das investigações sobre a ação do CLA em humanos, no sentido de reforçar as pesquisas brasileiras sobre o tema em questão e tornar disponível para a população, com o respaldo da legislação vigente, um produto seguro que possa ser utilizado como coadjuvante na prevenção e no controle da obesidade e de doenças associadas.

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