

Artigo Número 17

ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA)

Gustavo Gattás¹ & Gladstone Brumano

Introdução

O ácido linoléico conjugado, CLA, compreende um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (18:2) os quais têm apenas uma ligação simples entre insaturações. Embora possam existir diversos isômeros possíveis com esta característica, dois deles (cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12) têm despertado grandes interesse em funções dos seus efeitos biológicos já identificados.

O CLA afeta a deposição de gordura na carcaça de animais em crescimento, como camundongos e suínos (Park, et al., 1999; Ostrowska, et al., 1999). A maior parte dos experimentos conduzidos tem utilizado suplementos comerciais contendo uma mistura de isômeros do CLA. Porém, sabe-se hoje que o isômero que afeta o metabolismo lipídico, sendo o responsável pela inibição da secreção da gordura do leite e pela redução da gordura da carcaça é o trans-10, cis-12. O isômero cis-9, trans-11, não exerce efeito neste parâmetro (Baumgard, et al., 2000), porém está relacionado com a inibição de diversos tumores e com a modulação da resposta imune (Pariza, et al., 2001).

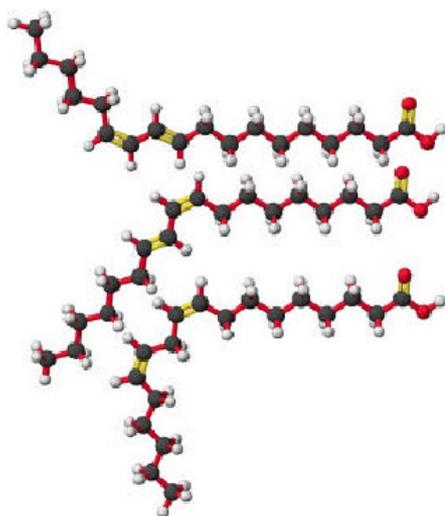
Os mecanismos pelos quais o isômero trans-10, cis-12 altera o metabolismo de lipídeo ainda não foram completamente elucidados. Possíveis pontos de regulação incluem, como por exemplo, o transporte intracelular de ácidos graxos, a dessaturação destes, a síntese de triglicerídeos e a formação e secreção do triglicerídeo e da gota lipídica. Infusões de trans-10, cis-12 no abomaso de vacas lactantes reduziram a secreção de gordura do leite e foram acompanhadas por uma redução na quantidade secretada de todos os ácidos graxos. Porém, a magnitude de redução dos ácidos graxos sintetizados pela via *de novo* foi maior, sugerindo possíveis efeitos do CLA na expressão gênica de enzimas lipogênicas (Baumgard, et al., 2002b). Há, portanto, uma gama de oportunidades oferecidas pelo uso das atividades metabólicas dos ácidos graxos que começa a ser exploradas com o CLA.

A Molécula

O ácido linoléico conjugado (CLA) refere-se a uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico com duplas ligações conjugadas, isto é, separadas apenas por uma ligação simples carbono-carbono.

Há 56 possíveis isômeros geométricos e de posição do CLA (Yuraweez, et al., 2001). Um dos isômeros, o cis-9, trans-11, foi identificado como um potente anticarcinogênico natural (Pariza & Há, 1990; Ip et al., 1991), enquanto o trans-10, cis-12 age como um agente repartidor de nutrientes muito efetivo (McGuire et al., 1997; Park et al., 1997). Estudos usando diferentes modelos animais relacionaram o CLA a vários outros efeitos positivos que poderiam favorecer a saúde humana, incluindo a redução de aterosclerose e prevenção e tratamento do *diabetes mellitus* não dependente de insulina (Sebedio et al., 1999).

¹ gustavogattas@yahoo.com.br



CLA trans-10, cis-12

CLA cis-9, trans-11

Ácido Linoléico (cis-9, cis-12)

12) Adaptado de Pariza (2000), citado por Hayashi (2003)

Produção do CLA

O CLA pode ser formado no rúmem pela biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados da dieta, mas também, endogenamente, através da dessaturação do ácido graxo C18:1 trans-11 por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo (Corl et al., 2001) chamada esteroil-CoA- dessaturase ou Delta-9 dessaturase (SCD). Como o C18:1 trans 11 (ácido vacênico) é produzido principalmente através da biohidrogenação ruminal, este processo é o grande responsável pelo fato de que as maiores fontes de CLA são produtos derivados de ruminantes.

Produção de CLA no Rúmem

Em ruminante, o CLA é produzido normalmente por bactérias ruminais, como um intermediário do processo de biohidrogenação do ácido linoléico, sendo a *Butyrivibrio fibrisolvens* a mais conhecida (Keler et al., 1966). A cis-12, trans-11 linoleato isomerase (EC 5.3.1.5), enzima que catalisa a transformação de ácido linoléico em ácido vacênico, precisa de radicais carboxila (COOH) livres para completar a reação (Keler et al., 1966). Isto implica necessariamente uma lipólise anterior à isomerização do galactolipídios, fosfolipídios e triglicerídeos da dieta.

Várias espécies de bactérias possuem um complexo capaz de hidrolisar as ligações éster dos ácidos graxos (Bauman & Griinari, 2001). A isomerização inicial é seguida pela saturação da dupla cis-9 através da ação de uma redutase, resultando no ácido vacênico (C18:1 trans-11). Este é o isômero trans encontrado em maior quantidade na gordura do

leite de ruminantes. A próxima etapa envolve uma redução subsequente até a formação do ácido esteárico (C18:0). Esta via metabólica é a mais conhecida e a mais expressiva (Harfoot & Haslewood, 1988). Normalmente, a biohidrogenação acontece de forma completa, porém, alguns produtos intermediários podem atravessar o rumem e serem utilizados na síntese de lipídios nos tecidos mamários adiposos.

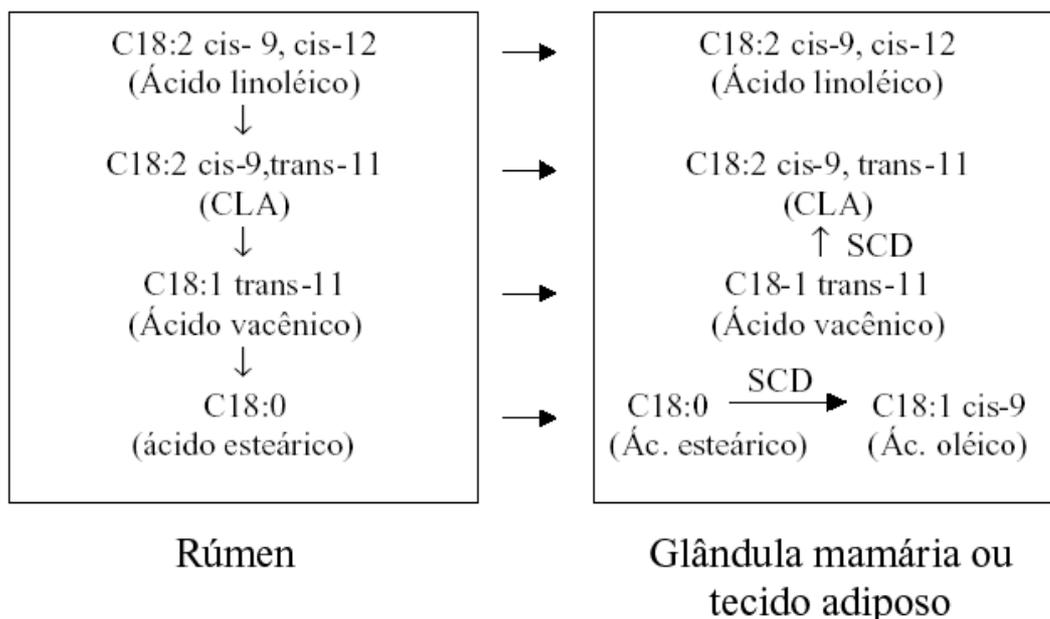


Figura 2 - Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2 cis-9, trans-11. Adaptado de Bauman & Griinari (2001).

Vários fatores podem influenciar a biohidrogenação ruminal e, conseqüentemente, a quantidade de ácidos graxos insaturados disponíveis para a deposição no tecido adiposo ou secreção na gordura do leite. O aumento da quantidade de concentrado na dieta leva a diminuição da biohidrogenação, devido à queda do pH ruminal e diminuição da lipólise no rúmen (Chouinard, et al., 1999b). Em monogástricos, os microorganismos do intestino também produzem CLA. Chin et al., (1994a) comprovaram que ratos convencionais, mas não ratos "germ free", são capazes de produzir CLA, utilizando ácido linoléico como substrato para bactérias intestinais.

Quando o CLA cis-9, trans-11 é absorvido pelo intestino, move-se para a corrente sanguínea e é absorvido pela glândula mamária para ser incorporado na gordura do leite. De maneira análoga, o ácido vacênico chega a mamaria, e pela ação da enzima SCD pode ser transformado em cis-9, trans-11 (Griinari et al., 2000).

Síntese do CLA via esteroil-coa dessaturase (scd)

A formação dos ácidos graxos insaturados, nos mamíferos, ocorre através das enzimas denominadas dessaturases. Nos animais, as dessaturações vão ocorrer até o carbono 9, não podendo ocorrer além desse, devido a ausência das dessaturases delta 12

e delta 15, presentes somente nos vegetais. Por este fato, o ácido linoléico é considerado ácido graxo essencial, devendo ser fornecido através da dieta por ser precursor essencial das prostaglandinas. A SCD introduz uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos. As reações catalisadas pelos sistemas dessaturases são essenciais para manter as características de fluidez das membranas celulares. E seus efeitos nas características de fluidez dos triglicerídeos do leite são críticos para manter para sua secreção normal (Perfield et al., 2002).

Para verificar a hipótese que o C18:1 trans-11 produzido no rúmem poderia ser convertido em CLA na glândula mamaria pela ação da enzima SCD, Griinari et al., (2000) infundiram no abomaso de vacas em lactação, uma mistura de c18:1 trans-11 e C18:1 trans-12 (50%-50%). Estes autores observaram um aumento de 31% na concentração de CLA cis-9, trans-11 secretado no leite. Deste modo, puderam concluir que os animais realmente foram capazes de sintetizar endogenamente o CLA cis-9, trans-11, demonstrando que uma via ativa de síntese endógena existe. Em um segundo experimento, o objetivo foi verificar qual era a contribuição da síntese endógena do CLA via SCD. Através da inclusão de óleo de esterculina (um potente inibidor da SCD), os autores verificaram que ocorria uma redução na concentração gordura do leite e outros produtos da ação da SCD, os quais foram indicados pelo aumento de duas a três vezes na relação da proporção de ácidos graxos 14:0/14:1, 16:0/16:1 e 18:0/18:1. Utilizando as mudanças na proporção de 14:0/14:1 como uma indicação da extensão da inibição da SCD, com o tratamento com óleo de esterculina, os autores estimaram que 64% do CLA na gordura do leite de ruminantes foi de origem endógena. Corroborando estes dados, Corl et al., (2001) demonstraram que o papel da síntese endógena do CLA é mais importante que a síntese pelas bactérias ruminais. Neste trabalho ocorreu uma marcada redução de 60-65% no CLA cis-9, trans -11 quando os animais receberam uma dieta suplementada com óleo de esterculina. Também foram observadas reduções de 84%, 59% e 46% para o C14:1 cis-9, C16:1 cis-9 e C18:1 cis-9, respectivamente. Da mesma forma, Kay et al., (2002) também suplementaram vacas sob regime de pastejo com óleo de esterculina no intuito de verificar a contribuição desta via na produção do CLA. Sob as condições a que estes animais estavam submetidos, os autores estimaram que 87 a 100% do CLA cis-9, trans-11, na gordura do leite foi de origem endógena. Estes autores ainda demonstraram que níveis de CLA cis-9, trans-11, no leite, poderiam ser aumentado quando os animais recebessem uma fonte de ácido graxo trans C18:1, tal como óleo de girassol.

Smith et al. (2002), estudando os efeitos da suplementação de CLA sobre a composição da gordura subcutânea de suínos observaram que existe um efeito do CLA na composição dos ácidos graxos destes tecidos, sendo uma dieta suplementada com 1,5% de CLA mostrou um aumento na concentração de ácido graxos saturados quando comparada a uma dieta suplementada com 1,5% de óleo de milho ou 1,5% de sebo bovino. No tratamento com CLA, verifica também, uma redução de 75% na atividade da SCD.

CLA em aves e suínos

A composição em ácidos graxos em monogástricos reflete fortemente aquela da dieta, uma vez que eles são ingeridos e passam pelo trato gastrointestinal destes animais praticamente inalterados (Rule et al., 1995). Desta forma, alterações no perfil lipídico destes animais são possíveis através da alimentação enriquecida com ácidos graxos de nosso interesse (Lawrence & Fowler, 1997). Entretanto, há limites de inclusão de ácidos graxos na dieta, como no caso de suínos, que o valor crítico de inclusão de ácido linoléico na dieta é de 0,035 MJ/MJ de energia digestível (Prescott & Wood, 1988). Valores superiores a este pode alterar o ponto de fusão da gordura subcutânea, interferindo negativamente na qualidade da carne.

O tecido adiposo das aves não sintetiza quantias substanciais de gordura, sendo, em última análise, dependente dos ácidos graxos de origem da digestão ou da síntese no fígado, o que justifica o tecido adiposo das aves raramente ocorrer longe dos capilares sanguíneos e ser bastante vascularizado.

Pode haver outros fatores dietéticos que interfiram na relação ácidos graxos saturados:insaturados, como a concentração de cobre na dieta. O cobre, por aumentar a atividade das dessaturases dos tecidos, pode diminuir esta relação (Lawrence & Fowler, 1997).

Em suínos, a meia vida dos ácidos graxos é cerca de 180 dias. Portanto, há cerca de 50% de chance de encontrarmos ácidos graxos depositados no início de sua vida (Enser et al., 1996).

Abaixo seguem alguns exemplos de perfis de ácidos graxos da gordura de alguns locais de ocorrência em suínos e frangos.

Perfis de ácidos graxos de suínos na gordura sub-cutânea, de carne magra, do músculo *latissimus* e da gordura de abdominal, da coxa e do peito de frangos.

Ácido Graxo	Suíno				Frango		
	Sub-cutânea	Longissimus	Latissimus	Abdominal	Coxa	Peito	
C14:0	1.8	1.3	1.0	1.0	0.4	0.3	0.3
C16:0	30.6	25.7	21.8	20.5	15.8	15.0	14.6
C16:1	1.9	5.7	2.7	2.0	1.6	NR	NR
C18:0	12.9	13.2	12.4	12.8	6.1	5.2	7.7
C18:1	25.8	42.2	35.9	36.0	33.4	24.9	19.4
C18:2	16.7	10.1	12.0	22.3	39.0	26.9	31.4
C18:3	NR	1.5	NR	1.3	0.8	0.4	0.5
C 20:4	0.2	0.3	1.5	NR	0.4	0.1	3.5
Referências	1	3	1	2	4	5	5

Referências: 1. Thiel-Cooper et al., 2001; 2. Ramsay et al., 2001; 3. Smith et al., 1996; 4. Sanz et al., 2000; 5. Crespo & Esteve-García, 2001.

Efeitos do CLA

Na composição corporal

Trabalhos têm mostrado que o CLA, principalmente o isômero trans-10, cis-12, tem efeitos na composição corporal de diversos modelos animais. Existem vários mecanismos propostos para explicar esta redução no conteúdo de gordura na carcaça. Entre estes, pode-se citar: 1) Diminuição na esterificação de ácidos graxos em triglicerídeos; 2) Interferência do isômero trans-10, cis-12 no programa de diferenciação dos adipócitos; 3) Diminuição da lipogênese e 4) Aumento da lipólise. Estes mecanismos serão descritos a seguir.

Cook et al. (2000) verificaram que a suplementação com 5% de CLA (18:2 trans-10, cis-12 sem o cis-9, trans-11) por um período de 3 semanas, na dieta de camundongos, diminuiu em 82% a deposição de gordura subcutânea comparada a uma dieta com 5% de ácido linoléico. Da mesma forma, Park et al. (1997) demonstrou que a suplementação com 0,5% de CLA (contendo o trans-10, cis-12) na dieta de ratos, diminuiu em 60% a deposição de gordura corporal dos animais e causou uma inibição direta na lipoproteína lipase em cultura de linhagem 3T3-L1 de adipócitos e um aumento significativo na concentração de glicerol no meio (22%), que pode ser considerado como um indicativo do aumento da lipólise. Possivelmente, este aumento na lipólise foi

acoplado a um aumento na oxidação de ácidos graxos nas células musculares e adipócitos, pois foi observado efeito do tratamento com CLA na atividade da carnitina-palmitoiltransferase (CPT) em ratos. Esta enzima seria o passo limitante para a beta-oxidação. O efeito foi significativo para o tecido adiposo epididimal dos animais sem restrição alimentar e, no músculo esquelético para os ratos em jejum. Não houve efeito para a CPT hepática. Portanto, o CLA aumentaria a beta-oxidação no músculo esquelético e tecido adiposo, mas não no fígado. Este aumento na beta-oxidação poderia estar prevenindo o estoque de triglicerídeos no tecido adiposo e desta forma estar reduzindo a massa adiposa dos animais.

Estudos conduzidos por Delany et al. (1999) também demonstraram que o CLA reduziu a deposição de gordura corporal em camundongos, aumentando o conteúdo total de proteína na carcaça, além de ter aumentado os níveis de insulina sérica. Uma possível explicação encontrada por estes autores seria a alteração na sensibilidade ou resposta máxima dos tecidos à insulina (i.e resistência à insulina). Assim, se os adipócitos tornarem-se resistentes à insulina após o tratamento com CLA, isto poderia explicar o paradoxal aumento da oxidação de ácidos graxos com o concomitante aumento da insulina plasmática. Se ao mesmo tempo o músculo esquelético permanecer sensível a insulina, o aumento dos níveis de insulina poderia levar a um aumento na síntese de proteína e deposição muscular.

O CLA também exerce efeito na deposição de gordura em outros modelos animais. Em suínos, Ostrowska et al. (1999) estudaram o efeito de diferentes doses de CLA sobre a composição corporal destes animais. Estes autores demonstraram que a redução na espessura de gordura subcutânea foi diretamente ligada ao aumento das doses de CLA administradas a estes animais. Com a maior dose de CLA (1% da dieta) os autores verificaram uma redução de 31% na deposição da gordura subcutânea. É provável que tenha ocorrido um efeito do CLA na lipogênese, uma vez que a dieta dos animais possuía elevadas quantidades de carboidratos e, assim, a síntese *de novo* poderia ser o mecanismo predominante na síntese de lipídeo.

Outra possibilidade para a redução na deposição de gordura poderia ser um aumento no gasto energético (West et al., 2000).

O aumento no processo de apoptose no adipócitos e processo de degradação celular poderiam contribuir ou ainda ser a causa primária para a diminuição na deposição de gordura em animais tratados com CLA. Tsuboyama et al. (2000) alimentando fêmeas de camundongo C57BL/6J com dietas semipurificadas com ou sem CLA (1%), e após 11 dias, verificaram uma diminuição no tamanho dos adipócitos em 41%, possivelmente causada por um aumento na expressão de necrose tumoral (TNF- α). Este fator causaria apoptose dos adipócitos. O autor também mediu os níveis de RNAm em varias enzimas envolvidas na lipogênese em ratos suplementados com CLA após 5 meses. Estes animais apresentaram uma marcada diminuição na abundancia dos RNAm da acetil Coa carboxilase (ACC) em 72% e de 82% do ácido graxo sintase (FAZ), enzimas chaves de regulação da síntese *de novo* na glândula mamaria e tecido adiposo. Entretanto como a expressão de varias enzimas lipogênicas é controlada pelo fator de transcrição SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1), o efeito do CLA na expressão do SREBP-1 também foi examinado. A abundância de RNAm deste fator de transcrição diminuiu com o tratamento e passou a ser 33% da abundância, comparado ao grupo controle.

Azaina et al. (2000) estudaram os efeitos do CLA na mudança da composição corporal de ratos "Sprague Dawley" suplementados com CLA por um período mínimo de 7 dias. Estes autores verificaram que não houve efeito do CLA no ganho de peso dos animais ou na ingestão alimentar, porém, ocorreu uma redução de 32% na gordura subcutânea de animais suplementados com doses de 0,5% de CLA. Além disto, ocorreu uma redução de 44% na velocidade de deposição de gordura (1,04 x 0,58g de ganho liquido, P<0,01). Os autores concluíram, também, que os efeitos do CLA na redução da gordura corporal ocorreram na fase de diferenciação dos adipócitos, através de uma

diminuição no tamanho, e não no número dos adipócitos. Esta teoria na redução da gordura corporal é consistente com mudanças metabólicas (diminuição da lipogênese e aumento da lipólise) reportadas previamente por Park et al. (1997).

Existem evidências (Evans et al., 2002) que o CLA pode exercer seu efeito na composição corporal através de um receptor nuclear, o receptor ativado proliferador de peroxissomo (PPAR α). PPAR α é um membro de uma família de receptores nucleares, que pertence a um tipo de fatores de transcrição regulatórios que são chaves na diferenciação dos adipócitos e no metabolismo lipídico. Este, quando ativado, pode modular a expressão gênica de numerosas enzimas que funcionam para transportar e oxidar ácidos graxos (Peters et al., 2001).

Efeitos anticancerígeno

Os tumores na glândula mamária são particularmente sensíveis aos efeitos do CLA, o que pode ser explicado, em parte, pela acumulação preferencial do CLA em lipídeos neutro de adipócitos que é o tipo de célula predominante no tecido mamário (Ip et al., 2001). Segundo Ip, o CLA depositado nos adipócitos pode teoricamente servir como "efeito parácrino" na regulação de crescimento das células epiteliais e dos principais isômeros (cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12) estaria envolvido. Ip et al. (2001b) descobriram que, além dos efeitos diretos do CLA no epitélio mamário, ele também age reduzindo a diferenciação das células do estroma mamário e na redução da capacidade do estroma mamário em formar redes microcapilares (angiogênese). Estes efeitos contribuíram para a inibição da carcinogênese mamária.

O estudo através de "differential display", mostrou que o tratamento com CLA leva a modulação de uma gama de biomarcadores que sugerem tanto um decréscimo na proliferação celular, como um aumento da apoptose (Ip et al., 2001). Resultados semelhantes são reportados por Whale et al. (2001), cujos estudos usando linhagens celulares de glândula mamária e próstata, nas quais foram usadas misturas de CLA e o uso dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 separadamente, evidenciaram efeitos em mecanismos de sinalização celular associados com inibição de gênese de tumores e proliferação celular que incluem: indução do redox de enzimas, atenuação da ativação do fator de transcrição induzida pela citoquinina, ativação de isoformas de proteína C quinases específicas envolvidas em eventos proliferativo ou apoptose, modulação da produção de eicosanóides (da expressão gênica a formação do produto). Há claramente uma interação nutriente-gene para os efeitos anticancerígenos deste ácido graxo.

Apesar dos resultados citados acima o mecanismo exato da ação anticarcinogênico do CLA, ainda não é bem compreendido. Pesquisas *in vivo* (Ip et al., 2001) haviam indicado que a ação anticarcinogênica do CLA era atribuída a sua ação antioxidante. Posteriormente, Zhang e Chen. (1997) observaram que o CLA não age como um antioxidante e, sim, acelerando a peroxidação lipídica. Entretanto, Igarashi e Miyazawa (2001) trabalhando com linhagens celulares humanas de hepatoma (HepG2) verificaram que a proliferação celular foi inibida na presença de CLA, quando comparados a células controle, após 72 horas. Para medir se o efeito inibitório do CLA no crescimento celular era originado da peroxidação lipídica, as células foram incubadas em um meio que continham antioxidantes como α -tocoferol e BHT. Entretanto, a adição destes antioxidantes, no meio com CLA, não reverteram à inibição do crescimento induzido pelo CLA. Os autores sugerem que o efeito inibitório do crescimento nestas células é causado por mudanças não conhecidas no metabolismo dos ácidos graxos, pois, o conteúdo de lipídio e ácidos graxos claramente aumentou nas células suplementadas com CLA, comparadas as células controle.

Conclusões

O CLA é uma substância que pode ser utilizada na nutrição de monogástricos como ferramenta para maximizar a produtividade.

Esta substância é um eficiente ativador da lipólise, além de minimizar a lipogênese. Desta forma o CLA atua melhorando a qualidade da carcaça, diminuindo a porcentagem de gordura e conseqüentemente aumentando a proporção de carne na carcaça. O CLA ainda atua aumentando a eficiência do sistema imune, sendo um importante anticancerígeno, tornando o animal menos susceptível a ação de doenças e em conseqüência desviando menos energia da produção para a manutenção da defesa imunológica.

Assim, a utilização de CLA na dieta dos animais pode melhorar a eficiência produtiva de uma maneira multifatorial, hora tornando o animal mais resistente contra a ação de doenças, hora melhorando a qualidade final da carcaça.

Referências Bibliográficas

FERRER, P.A.R. **Importância de los ácidos grasos poliinsaturados em la alimentación Del lactante.** Arch. argent. pediatr, pág. 231 – 238, 2000.

GÓMEZ M. E. D. B., et al. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** Tese para obtenção do grau de Doutor. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003.

HAYASHI, A.A. **Efeito da suplementação com ácido linoléico conjugado (CLA) na composição do leite, no perfil de ácidos graxos e na atividade de enzimas lipogênicas em ratas lactantes.** Tese para obtenção do grau de Mestre. Universidade de São Paulo, escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo, 2003.

MALGOR, V. **Prostaglandinas y productos relacionados.** Farmacología de los eicosanoides, cap. 6, pag. 93-111.

MEDEIROS, S.R. **Ácido linoléico conjugado: Teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado.** Tese para obtenção do grau de Doutor. Universidade de São Paulo, escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, São Paulo, 2002.

OSTROWSKA, E.; Muralitharan, Morley.; Cross, R.F.; Bauman, D.E.; Dunshea, F.R. **Dietary Conjugated Linoleic Acids Increase Lean Tissue and Decrease Fat Deposition in Growing Pigs.** J. Nutr. 129: 2037-2042, 1999.