



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

LILIANA RUTE MAIA FERREIRA DA MOTA

***O ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) E A
SAÚDE HUMANA***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE NUTRIÇÃO CLÍNICA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSOR DOUTOR FERNANDO JOSÉ LOPES DOS SANTOS**

MARÇO/2013

***O ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) E A SAÚDE
HUMANA***

Liliana Rute Maia Ferreira da Mota

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Liliana.rmfm@gmail.com

Avenida Bissaya Barreto, nº137, r/c, 3000-076 Coimbra

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	5
Resumo.....	8
Introdução.....	12
Metodologia	14
Desenvolvimento.....	15
O que é o CLA?.....	15
O seu metabolismo	17
Efeitos na saúde:.....	18
Propriedades anticarcinogénicas	18
Composição corporal	22
Sensibilidade à insulina.....	28
Perfil lipídico	29
• No colesterol total (CT) e no c-LDL.....	30
• No c-HDL	30
• No índice aterogénico	31
• Nos Triglicéridos.....	31
• Na Lipoproteína (a).....	32
• Resumo das propriedades do CLA no perfil lipídico.....	32
Sistema imune.....	33

No exercício e na força	35
Prevenção da doença cardiovascular	36
Saúde do osso.....	39
Efeitos adversos	41
Conclusão	42
Agradecimentos.....	45
Bibliografia.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

aP2 – Proteína adipocitária ligadora de ácidos gordos

C/EBP α - CCAAT/enhancer-binding protein alpha

c-HDL – Lipoproteína de alta densidade do colesterol

Caco-2 – *Heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma*

CLA – Ácido Linoleico Conjugado

c-LDL - Lipoproteína de baixa densidade do colesterol

CML – Células do músculo liso

COX-2 – Ciclooxigenase-2

CT – Colesterol total

CVE – Células vasculares endoteliais

DCV – Doenças cardiovasculares

erbB2/her2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

ERK – Proteína quinase

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 – Interleucina-1

IL-10 – Interleucina-10

IL-2 – Interleucina-2

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IMC – Índice de massa corporal

iNOS – Sintetase óxido nítrico induzível

LA – Ácido Linoleico

Lp (a) – Lipoproteína a

LT CD8⁺ - Linfócitos T CD8⁺

LXR- α – Recetor x hepático alfa

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitogénio

MGC – Massa gorda corporal

MMC – Massa magra corporal

NO – Óxido nítrico

PA – Perímetro abdominal

PC – Peso corporal

PCR – Proteína C Reativa

PGE₂ – Prostaglandina E

PPAR - Recetor ativado por proliferador de peroxissomo

SCD - Dessaturase do esterol CoA

SREBP-1c – Proteínas de ligação ao elemento de resposta ao esterol

TG - Triglicerídeos

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

Introdução: O Ácido Linoleico Conjugado (CLA) é um ácido gordo poliinsaturado que quimicamente corresponde a um grupo de isômeros derivados do Ácido Linoleico. Está presente na alimentação humana, principalmente em alimentos derivados de animais ruminantes, como a carne bovina, o leite e derivados. Foi considerado inicialmente como um agente anticarcinogénico mas, com o passar dos anos, outros efeitos biológicos têm-lhe sido atribuídos, como a prevenção da obesidade, da aterosclerose e de diabetes. Os principais isômeros bioativos são o *cis-9,trans-11*, mais relacionado com propriedades anticancerígenas, e o *trans-10,cis-12*, mais associado a alterações da composição corporal.

Objetivo: Efetuar uma revisão das investigações realizadas até ao momento. Examinar os efeitos do consumo do CLA na saúde humana. Discutir a dose de ingestão recomendada e a utilização de produtos naturalmente enriquecidos ou suplementos de CLA com fins terapêuticos. Averiguar a segurança da suplementação. Aprofundar os dados disponíveis para conseguirmos influenciar estratégias futuras e definir se se justifica a realização de mais estudos.

Métodos: Foram pesquisados artigos científicos publicados entre 2005 e 2012, nas bases de dados da “Pubmed” e da “b-on”, usando as seguintes combinações de palavras: “Conjugated linoleic acid”; “CLA”; “Metabolism”; “Human health”; “Cardiovascular diseases/prevention”; “Cancer/prevention”; “Obesity”; “Body composition”. A pesquisa incidiu sobre o ácido linoleico conjugado e os seus isômeros principais bem como as suas repercussões na saúde humana, especificamente na prevenção de neoplasias, de doenças cardiovasculares, na sensibilidade à insulina, sistema imune, na composição corporal e no perfil lipídico.

Conclusões: Os efeitos biológicos do CLA estão cientificamente provados em modelos animais. No entanto, a extrapolação para humanos carece de mais evidências. O CLA provou ser seguro quando administrado numa dose de 3.5 g/dia. Após 2 anos de suplementação já não há evidências dos seus efeitos. A redução da composição corporal foi mais evidente em doses de 3-4 g/dia, durante 12 semanas, em indivíduos obesos ou com excesso de peso. O isómero *cis-9,trans-11* demonstrou ser um anticarcinogénico mais potente, enquanto o isómero *trans-10,cis-12* está mais associado às alterações da composição corporal. São necessários mais estudos, principalmente a longo-prazo, que possam minimizar as diferenças entre indivíduos ao longo do plano experimental. Estudos futuros devem incorporar uma vigilância mais apertada em pontos cruciais como: a alimentação que os sujeitos fazem na sua casa; no tipo de exercício que praticam ao longo do estudo; possíveis interações do CLA com outras substâncias.

A suplementação pode ser aconselhada mas as pessoas devem ser bem informadas quanto às regras subjacentes e deve-se dar preferência aos alimentos naturais ricos neste composto. Os produtos naturais enriquecidos em CLA e os suplementos, podem ser aconselhados em ocasiões específicas, uma vez que as doses existentes na dieta habitual estão abaixo das doses propostas na literatura.

Palavras-chave: “Conjugated linoleic acid”; “CLA”; “Metabolism”; “Human health”; “Cardiovascular diseases/prevention”; “Cancer/prevention”; “Obesity”; “Body composition”.

ABSTRACT

Introduction: Conjugated linoleic acid (CLA) is a polyunsaturated fatty acid which chemically corresponds to a group of isomers derived from linoleic acid. It is present in our food, especially those obtained from ruminant animals, such as beef, milk and other dairy products. At first it was seen as an anticarcinogenic agent but some other biologic effects are known, such as prevention of obesity, atherosclerosis and diabetes. The main isomers with biologic activity are cis-9,trans-11, related with anti-carcinogenic properties, and trans-10,cis-12, associated to changes of body composition.

Objectives: Review of the research done to date and examination of the effects of CLA on human health. Discuss the recommended level of intake and use of products naturally enriched with CLA supplementation or therapeutic purposes. Investigation of the safety of its supplementation. Evaluation of the available data so it will be possible to influence future strategies and determine if further studies are justifiable.

Methods: For this review, I researched scientific articles published between 2005 and 2012 in the databases of "Pubmed" and "b-on" using following keywords: "Conjugated linoleic acid", "CLA", "Metabolism", "Human health", "Cardiovascular diseases/prevention", "Cancer/prevention" and "Obesity". The research was related to conjugated linoleic acid, its main isomers and their impact on human health, particularly the prevention of cancer, cardiovascular disease, insulin sensitivity, immune system, body composition and lipid profile.

Conclusion: Although the biological effects of CLA were quite evident in animals, its extrapolation to human needs more evidence. CLA has proven to be safe when administered at a dose of 3.5 g per day. The CLA supplementation no longer has beneficial effects when it is done for more than 2 years. The body reduction was most evident at doses of 3-4 g per day

for 12 weeks in obese or overweight individual. Cis-9,trans-11 isomer was seen as a more potent anticarcinogenic agent, while trans-10,cis-12 were mainly associated with body composition changes. I concluded that more studies are needed, especially long-term ones, which may minimize the differences between individuals along the experimental plan. Further studies should incorporate closer monitoring in crucial points, as: food that individuals make in their home, the type of exercise practiced throughout the study and possible interactions of CLA with other substances. The supplementation can be recommended but people should be informed about inherent rules and natural food with high levels of this compound should be preferred. Products naturally enriched with CLA and supplements might be recommended in some specific occasions, since regular doses in food do not correspond to those therapeutic doses found in these studies.

Keywords: “Conjugated linoleic acid”; “CLA”; “Metabolism”; “Human health”; “Cardiovascular diseases/prevention”; “Cancer/prevention”; “Obesity”; “Body composition”.

INTRODUÇÃO

A designação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) refere-se a um grupo de isômeros derivados do Ácido Linoleico (LA).¹⁻¹⁴ O LA é um ácido gordo que contém 18 carbonos e 2 ligações duplas na configuração *cis* no 9º e 12º carbono.^{2,8} Os isômeros do CLA são caracterizados por terem duplas ligações conjugadas (ao contrário do LA) em várias posições e conformações.^{1-6,9-11,13}

Existem duas fontes predominantes destes ácidos gordos: os que são formados através da biohidrogenação incompleta em animais ruminantes, em que o ácido linoleico é convertido em diferentes isômeros do CLA e os que são sintetizados pela hidrogenação parcial industrial.^{1-3,15,16} É também formado endogenamente, a partir da dessaturação do ácido vacénico ingerido, em animais e em humanos, pela enzima Δ -9 dessaturase.^{13,16-18}

Assim, o CLA existe naturalmente em produtos alimentares do nosso dia-a-dia, como por exemplo na carne, leite e derivados lácteos resultantes de animais ruminantes.^{1,3,6-8,11,13,17,19} O consumo médio diário de CLA é de aproximadamente 152 mg até 212 mg nas mulheres e homens não vegetarianos, respetivamente.^{2,4,18,20} Os níveis séricos em humanos variam entre os 10 $\mu\text{mol/L}$ e os 70 $\mu\text{mol/L}$.²

Desde a sua descoberta, as investigações sobre o CLA têm sido dirigidas principalmente para as suas potenciais capacidades na promoção da saúde humana. Ao longo dos anos, têm-lhe sido atribuídos vários efeitos biológicos.^{3,8,10,17} Entre outros, foram reportados: propriedades anticancerígenas; modificações da composição corporal com diminuição da massa gorda e do peso corporal e aumento da massa magra; aumento da sensibilidade à insulina; alterações do metabolismo das lipoproteínas; aumento da densidade mineral óssea; alterações no sistema imune com repercussões positivas nas respostas

inflamatórias. Os efeitos são dependentes da dose, do isômero e dos modelos usados nos estudos.^{6,8,12,13,17,21}

Destes efeitos podem resultar diminuição da prevalência da obesidade, de diabetes, de cancro, de diferentes expressões da doença aterosclerótica e de osteoporose. A maior parte destas doenças é muito prevalente na nossa sociedade, tornando-se a procura por soluções eficazes cada vez maior. As diversas indústrias tentam utilizar o marketing e a publicidade para influenciar a sociedade. Neste momento, já são vendidos e utilizados suplementos de CLA. As misturas dos isômeros *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12* de CLA são as mais produzidas a nível industrial e posteriormente colocadas no mercado como suplementos.^{3,9,12,16}

A suplementação com CLA atinge atualmente níveis significativos, sendo praticada pelos indivíduos de várias faixas etárias por motivos diversos que vão desde a prevenção de doenças cardiovasculares e cancerígenas, até à modificação da composição corporal e cultura do físico. Torna-se imperativo acompanhar o progresso da sociedade e investigar se o consumo regular é, ou não, justificado. Desta forma, têm surgido cada vez mais investigações que procuram estudar os efeitos da suplementação com este ácido gordo e um futuro aumento da concentração do CLA ingerido na dieta.^{1,3}

O objetivo deste trabalho é efetuar uma revisão das investigações realizadas até ao momento. Examinar o papel do CLA nos efeitos da saúde humana. Discutir a dose de ingestão recomendada e a utilização de produtos naturalmente enriquecidos ou suplementos de CLA com fins terapêuticos. Averiguar a segurança da suplementação. Aprofundar os dados disponíveis para conseguirmos influenciar estratégias futuras e definir se se justifica a realização de mais estudos.

METODOLOGIA

A revisão baseou-se numa pesquisa efetuada nas bases de dados da “Pubmed” e da “b-on”, usando a seguinte combinação de palavras: “Conjugated linoleic acid”; “CLA”; “Metabolism”; “Human health”; “Cardiovascular diseases/prevention”; “Cancer/prevention”; “Obesity”; “Body composition”.

Dessa pesquisa foram escolhidos cerca de 50 artigos com ordem de importância em relação ao ano de publicação e interesse do tema. A estes juntaram-se outros considerados pertinentes e obtidos a partir da pesquisa original.

DESENVOLVIMENTO

O que é o CLA?

O CLA foi inicialmente descoberto por Pariza et al em 1987, e foi primeiramente identificado como um anticarcinogénico,^{2,12} isolado da carne bovina.¹² Posteriormente, foi demonstrado que o CLA apresentava propriedades antiateroscleróticas e antiobesidade.² Devido ao aumento da prevalência dessas doenças nos últimos 30 anos, o interesse no CLA como tratamento para a perda de peso tem aumentado.²

O Ácido Linoleico Conjugado (CLA) refere-se a um grupo de isómeros derivados do Ácido Linoleico (LA).¹⁻¹⁴ O CLA é um ácido gordo pertencente ao grupo dos ácidos gordos poliinsaturados,^{18,22} sendo os isómeros do CLA caracterizados por terem duplas ligações conjugadas em várias posições e conformações.^{1-6,9-11,13} (Figura 1) São-lhes atribuídos vários efeitos biológicos,^{3,8,10,17} tais como: efeitos na prevenção da obesidade, do cancro, de diabetes, ou da aterosclerose, dependendo da dose específica, do isómero ou dos modelos usados.^{8,12,13,17}

Existem 28 possíveis isómeros de CLA^{3,17} (com variedade entre *cis/cis*, *trans/trans*, *cis/trans* e *trans/cis*), sendo 2 deles – *cis-9,trans-11-CLA* e *trans-10,cis-12-CLA* – conhecidos por possuírem maior atividade biológica.^{1-3,8,23,24}

O CLA pode ser encontrado naturalmente na comida, sendo que constitui uma pequena parte da fração lipídica da carne, leite e dos derivados lácteos resultantes de animais ruminantes,^{1,3,6-8,11,13,17,19} (como as vacas e ovelhas).¹¹ Das fontes naturais, a gordura do leite de vaca é a mais rica em CLA.³ No entanto, o conteúdo em CLA nestes animais é muito variável. Depende de vários fatores como a sua alimentação, a idade, a raça, fatores sazonais,¹ ou diferenças no seu metabolismo³. A altitude, espécie e a lactação também podem influenciar os níveis de CLA.³

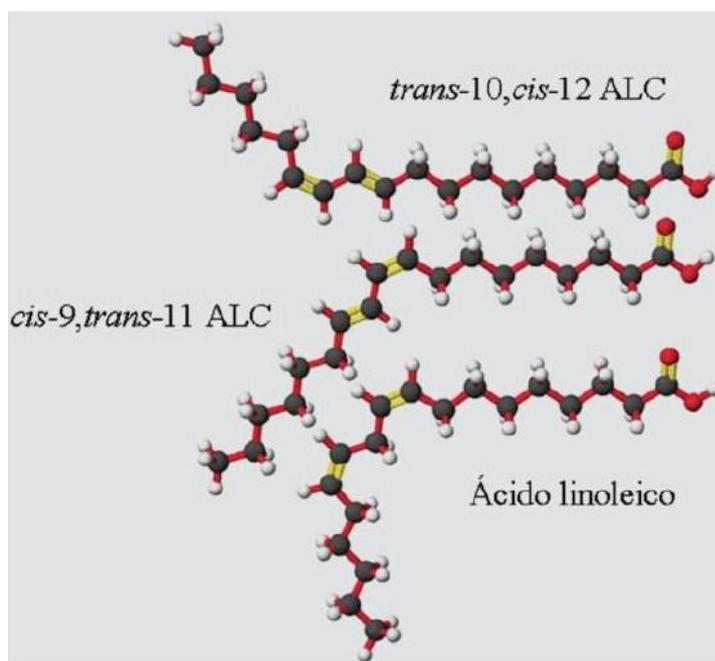


Figura 1: Estrutura dos isômeros *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12* do CLA.¹¹

Existem duas fontes predominantes destes ácidos gordos: os que são formados através da biohidrogenação incompleta em animais ruminantes, em que o ácido linoleico é convertido em diferentes isômeros do CLA e os que são sintetizados pela hidrogenação parcial industrial.^{1-3,15,16} O processo de biohidrogenação modifica a posição e configuração das duplas ligações, resultando numa ligação simples entre uma, ou ambas as ligações duplas [i.e., *cis-9,trans-11* (9,11) ou *trans-10,cis-12* (10,12) ácido octadecadienoico].² O CLA é também formado endogenamente, a partir da dessaturação do ácido vacénico ingerido, em animais e em humanos, pela enzima Δ -9 dessaturase.^{13,16-18}

Desde que o CLA foi associado a efeitos benéficos na saúde que, para além da sua ingestão através de produtos naturais, começaram a ser realizadas investigações sobre a suplementação com este ácido gordo.¹ Os suplementos estão largamente disponíveis em supermercados, drogarias e via internet onde são normalmente vendidos como agentes para a perda de peso.^{13,17} As misturas de *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12* de CLA são as mais

produzidas industrialmente e posteriormente vendidas como suplementos.^{3,9,12,16} As gorduras derivadas de animais ruminantes ou produzidas de modo industrial contêm a mesma espécie de ácidos gordos *trans*, mas em proporções diferentes.^{2,9,12,16,17} A principal diferença nas proporções dos isômeros é a elevada percentagem do isômero *trans-10,cis-12* encontrada nos suplementos.^{13,17} Para além deste, os isômeros major encontrados na forma industrial são o *trans-9* e pequenas quantidades de *trans-8* e *trans-11*. No entanto, o isômero *cis-9,trans-11*, também conhecido como ácido ruménico, é a forma predominante de CLA encontrada naturalmente nas comidas.^{2,9,12,13,16,17} Nos produtos lácteos e carnes derivadas de animais ruminantes, 80-90% é constituída pelo ácido ruménico³ e 10-20% pelo isômero *trans-10,cis-12*.^{2,11,14}

O seu metabolismo

O CLA é sintetizado através da atividade da bactéria *Butyrivibrio fibrosolvens*, presente no rúmen, que vai isomerar o LA produzindo CLA. O isômero *cis-9,trans-11* pode ser absorvido e integrado nos tecidos, ou biohidrogenado formando ácido vacénico. Depois da sua absorção, o ácido vacénico pode ser armazenado ou convertido no isômero *cis-9,trans-11*, através da incorporação de uma ligação *cis* dupla na posição 9, devido à atividade da enzima Δ -9 dessaturase ou SCD, que está presente não só no intestino mas também nas glândulas mamárias e tecido adiposo. Como os mamíferos não têm a enzima Δ -12 dessaturase, o ácido vacénico não é transformado no isômero *trans-10,cis-12*. Deste modo, a presença deste isômero nos tecidos vai ser determinada exclusivamente pela sua síntese no rúmen. Há outras bactérias, para além da supracitada, que têm a capacidade para sintetizar o CLA, como as do género *Propionibacter*. Além disto, o CLA pode também ser sintetizado pelo processo de hidrogenação parcial como já foi referido, usado na indústria alimentar para o desenvolvimento de gorduras, como as margarinas. Nestes produtos, a concentração do CLA depende do tipo de hidrogenação.¹¹

O metabolismo dos isômeros do CLA é realizado por diferentes vias. Os metabolitos do CLA, (CD 18:3; CD 20:3; CD 20:4) foram detetados nas glândulas mamárias e no fígado de ratos e no tecido adiposo em humanos. Estes metabolitos são formados através do alongamento dos isômeros do CLA devido à ação de enzimas dessaturases (Δ -5 e Δ -6) e elongases.^{11,25} Há, no entanto, diferenças entre o processo metabólico dos dois principais isômeros. Assim, enquanto o isômero *cis*-9,*trans*-11 é facilmente metabolizado a CD 20:4, o *trans*-10,*cis*-12 aparenta mostrar uma certa resistência a ser transformado em CD 20:3 e CD 20:4. Até ao momento não existe uma explicação clara para estas diferenças. Contudo, o CD 18:3, derivado do isômero *trans*-10,*cis*-12, parece apresentar uma maior resistência a processos de alongamento. A via metabólica major para a degradação de ácidos gordos é a β -oxidação, tanto mitocondrial como peroxissomal. No caso do CLA, a β -oxidação mitocondrial é menor do que no LA. Em relação aos isômeros do CLA, o *trans*-10,*cis*-12 parece ser oxidado mais rapidamente que o *cis*-9,*trans*-11, devido à posição das ligações duplas.¹¹

Efeitos na saúde:

Propriedades anticarcinogénicas

Os estudos realizados têm identificado potenciais efeitos benéficos do CLA na prevenção de diferentes neoplasias.^{3,6,26} A sua maior eficácia é evidenciada em estudos animais e *in vitro*.^{3,21}

Em estudos animais, o CLA parece inibir a iniciação, promoção e progressão da carcinogénese em vários órgãos, como a mama, a próstata e o cólon.^{6,12,14} Em estudos anteriores, a inibição da carcinogénese foi dependente das concentrações dietéticas da mistura de CLA, que variava de 0.05-0.1% da dieta dos animais.¹² Em investigações passadas, o isômero *cis*-9,*trans*-11 purificado demonstrou reduzir a carcinogénese na sua maioria.

Similarmente, o *trans*-10,*cis*-12 também diminui, na sua maioria, a carcinogénese mas, em contraste, aumentou-a em alguns estudos.^{3,12}

In vitro, o CLA tem demonstrado inibir a proliferação de células cancerígenas na mama, bexiga, próstata e aparelho digestivo.^{6,12} Para além disso, os isómeros do CLA (particularmente o isómero *trans*-10,*cis*-12) também demonstraram ser eficazes não só na inibição do crescimento tumoral, mas também na indução da apoptose em linhas celulares de cancro da mama.^{9,27} Resultados das investigações realizadas *in vitro* sugeriram que os efeitos dos dois diferentes isómeros de CLA variavam de acordo com o modelo cancerígeno examinado.^{3,14} A maior parte destes estudos focou-se nas linhas celulares tumorais derivadas das glândulas mamárias, próstata e aparelho digestivo ou nas suas metástases.^{12,14} Na maioria dos estudos o isómero *trans*-10,*cis*-12 demonstrava efeitos inibitórios no crescimento das linhas celulares do cancro da próstata¹⁴, da mama, do cólon, colorrectal e gástrico.^{3,12} O isómero *cis*-9,*trans*-11 no entanto só revelou efeitos inibitórios numa pequena fração desses estudos.^{3,12} Porém, o *cis*-9,*trans*-11 provou ser mais potente do que o *trans*-10,*cis*-12.^{3,12,28} Muitos dos estudos não detetaram inibição do crescimento celular por parte deste isómero quando era usado em concentrações inferiores a 50 µmol/L. Quando usado numa concentração de 100 µmol/L, este isómero provou ser capaz de inibir o crescimento de linhas celulares do adenocarcinoma gástrico humano.¹² Nos estudos que utilizaram apenas o isómero *trans*-10,*cis*-12, concluíram que: usando doses de 50-100 µmol/L, após 6 dias houve uma inibição da proliferação da linha celular do cancro do cólon em aproximadamente 50%; após 6 dias de suplementação com 50 µmol/L, ocorreu uma inibição da proliferação das linhas celulares do cancro da próstata em aproximadamente 50%; o tratamento com 50-100 µmol/L deste isómero por 6 dias, inibiu a proliferação em aproximadamente 80% das linhas celulares do cancro da mama.¹⁴

Ao contrário do que tem acontecido com modelos animais, apenas um pequeno número de estudos em humanos sobre o CLA e o cancro têm sido reportados.²¹ O primeiro estudo foi realizado em 1996 por Knekt et al. onde foi sugerido que o CLA teria propriedades protetoras. Neste estudo de coorte, começaram por examinar a ingestão diária de produtos lácteos em 4697 mulheres sem cancro, com 15 anos de idade ou mais velhas. Um follow-up num período de 25 anos foi usado para coletar dados do consumo alimentar, que indicaram uma forte relação inversa entre o consumo de leite e a incidência de cancro da mama nas participantes do estudo. Isto sugeriu assim, um efeito protetor, relacionado com o consumo de leite e o CLA foi identificado como um dos potenciais componentes ativos do leite.^{21,29}

Depois deste estudo outros foram realizados o que permitiu chegar a conclusões. O CLA tem mostrado efeitos anticarcinogénicos consistentes em humanos, contra diversos tipos de cancro experimental, salientando o cancro da mama.^{3,9,26} Enquanto uns estudos ressaltavam as ações positivas do CLA com efeito anticarcinogénico no cancro da mama em mulheres pós-menopáusicas,³⁰ outros reportavam que a ingestão de CLA teve uma fraca (ou nenhuma) relação com a incidência desse cancro.²¹ Nos estudos que afirmam o efeito benéfico do CLA, foi demonstrado que as suas concentrações séricas e dietéticas estavam diminuídas nas mulheres pós-menopáusicas com cancro da mama, comparativamente ao grupo controlo, reafirmando assim o seu papel protetor.³

Aproximadamente 25-30% dos cancros da mama sobreexpressam o gene *erbB2/her2*.⁹ Investigações mais recentes vieram sugerir que em modelos animais de cancro da mama, onde o gene *erbB2/her2* está sobreexpresso, enquanto o *cis-9,trans-11* não teria qualquer ação, o isómero *trans-10,cis-12* iria estimular a carcinogénese^{3,9,31} e favorecer as metástases pulmonares.⁹ No mesmo trabalho foi demonstrado que a redução dos tumores era da mesma ordem de magnitude quer a fonte do CLA fosse natural, quer fosse sintética.³ As evidências

comprovam que o isómero *trans*-10,*cis*-12 é deletério neste grupo. Um estudo de 4 semanas de suplementação com este isómero, não só estimulou o crescimento dos tumores mamários existentes, como também aumentou o aparecimento de novos tumores.⁹

Noutros estudos realizados sobre a relação entre o CLA e o cancro colorrectal, foi relatado uma correlação inversa, em mulheres.²¹ As condições de cultura, incluindo as concentrações usadas de CLA, a duração do tratamento e o tipo de tumor assim como as linhas celulares usadas, parecem determinar qual dos isómeros de CLA irá afetar o crescimento celular.¹²

Em investigações efetuadas sobre a ingestão de leite (fonte de CLA) e a ligação deste com o cancro, foi concluído que o leite provavelmente protege contra o cancro colorrectal.³

Os mecanismos relativos à propriedade anticarcinogénica do CLA, não estão ainda totalmente compreendidos.^{3,6,14} As hipóteses atuais sugerem que pode atuar por mecanismos antioxidantes, pró-oxidante da citotoxicidade, por inibição da síntese de nucleotídeos e proteínas, por redução da atividade de proliferação celular, por inibição dos aductos de DNA e da ativação carcinogénica³, ou ainda por promoção da apoptose e modulação da angiogénese. Alguns resultados obtidos sugerem que os efeitos do CLA como um agente antiproliferativo, acontecem por inibição das vias de sinalização Akt, ERK e ER α .⁶ A inibição destas vias de sinalização pode contribuir fortemente para regular a interação entre a formação e a separação dos contatos adesivos das células tumorais com a matriz extracelular, reduzindo assim, a invasão de células cancerígenas mamárias e a sua metastização.⁶ Recentemente, as propriedades anticarcinogénicas do CLA têm sido atribuídas, também, às suas propriedades anti-inflamatórias através da subregulação de genes como o TNF- α , IL-1 β e IL-6.^{14,32}

Atualmente as evidências dos efeitos anticarcinogénicos do CLA em humanos estão limitadas ao estudo observacional, com ampla evidência epidemiológica não focada

especificamente no CLA, mas sim na ingestão de leite e produtos diários.³ Devido ao número limitado de publicações, não é ainda possível concluir se o CLA ajuda, ou não, na prevenção do cancro, uma vez que as evidências disponíveis são variáveis.^{3,21} Aparentemente, os efeitos do CLA são dependentes do local do cancro devido à complexa essência da dieta, do ambiente e das interações dos nutrientes.³

Composição corporal

A prevalência de pessoas com excesso de peso, ou algum grau de obesidade, tem aumentado drasticamente nas últimas décadas.⁷

A obesidade, se não for tratada, é um fator de risco para muitas patologias como por exemplo doenças cardiovasculares, certos tipos de neoplasias e Diabetes Mellitus tipo 2.^{3,21,23} Mais recentemente, a obesidade foi reconhecida como sendo um estado de inflamação sistémica de baixo grau ou crónica, devido à circulação anormal de níveis de moléculas inflamatórias como o TNF- α , leptina e IL-6, que são secretadas no tecido adiposo.³

Como a perda de peso em pessoas obesas é difícil de obter e manter, abordagens dietéticas, farmacêuticas e nutricionais têm sido alvo de grande interesse e investigação, devido à crescente necessidade de encontrar moléculas capazes de combater a obesidade.²³

O principal interesse na utilização do CLA centra-se na sua capacidade para controlar a gordura corporal em animais e humanos.^{4,7,8,21}

Dos dois isómeros principais do CLA, o *trans-10,cis-12* tem sido positivamente associado a efeitos de antiobesidade,^{2-4,8,10,18,21} através da redução de massa gorda corporal (MGC).^{2,3,21} O isómero de CLA *trans-10,cis-12*, mas não o *cis-9,trans-11*, provou suprimir a síntese lipídica *de novo*, dentro de 3-24 horas.⁸ *In vitro*, foi demonstrado que o mesmo isómero impedia a acumulação de triglicéridos (TG) nas culturas de pré-adipócitos humanos

em diferenciação,¹⁰ enquanto o isômero *cis-9,trans-11* aumentava o conteúdo em TG. Este efeito pode ser devido em parte à redução da absorção de lípidos pelos adipócitos devido aos efeitos do CLA na dessaturase do esterol CoA (SCD) e na atividade da lipoproteína lipase.³

Park et al, foi o primeiro a demonstrar que o CLA modulava a composição corporal.² No seu estudo em animais, nas fêmeas e machos aos quais foi dado uma mistura de CLA, houve uma redução de 60% e 57% respectivamente da sua massa gorda corporal, comparativamente ao grupo controle.^{2,4} Outros estudos em animais, indicaram que o CLA atua nos metabolismos dos lípidos e da glicose, promovendo efeitos antidiabetogénicos, antiaterogénicos, hipocolesterolémicos, hipotrigliceridémicos, melhorias no sistema imunológico e diminuição do tecido adiposo, entre outros.¹⁸

Nas pesquisas de Wets et al, foi demonstrado que uma dieta com suplementação de CLA, aumentava o gasto energético em animais. Num destes estudos, o CLA foi adicionado à dieta contendo desde 15% a 45% de lípidos em relação ao aporte calórico total durante 6 semanas. No final desta experiência, o CLA forneceu reduções do tecido adiposo variando entre 43%-88%, além de que diminuiu a absorção de energia e aumentou a taxa metabólica basal, independentemente da dieta administrada – hipo ou hipercalórica.^{18,33,34} As evidências tão promissoras em estudos animais, levaram à execução de diversas investigações em humanos, de modo a indagar sobre o efeito do CLA na composição corporal de indivíduos com peso normal, com excesso de peso ou obesos. A maioria destes ensaios utilizou uma mistura de CLA 50:50 (*cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12*). Para além das investigações realizadas com mistura de CLA, foram também investigados, os efeitos individuais dos isómeros de CLA na composição corporal. Os resultados dos estudos mostraram que o consumo de *cis-9,trans-11* (0.59-3g/dia) ou de *trans-10,cis-12* (0.6-3.4g/dia) individualmente, não alterava a composição corporal.³

Os resultados em ensaios clínicos em humanos foram inconsistentes.^{3,4} Um grande número reportou correlações positivas entre a suplementação com o CLA e vários fatores relacionados com a obesidade. No geral, comprovou-se uma redução do peso corporal (PC) e da MGC^{2,7} e um melhoramento da massa magra (MMC), do índice de massa corporal (IMC) e do perímetro abdominal (PA).²¹

Investigações sobre os efeitos do CLA na redução de MGC em humanos levaram a distintas conclusões. Enquanto alguns estudos evidenciaram uma melhoria desta massa com o uso de suplementação, outros não obtiveram quaisquer alterações na composição corporal. Por exemplo, a suplementação da mistura de CLA (3-4 g/dia durante 24 semanas) em homens com excesso de peso ou obesos, diminuiu a MGC e aumentou a MMG. No entanto, a suplementação com mistura de CLA em iogurtes (3.76 g/dia durante 14 semanas), em homens saudáveis, não teve qualquer efeito na composição corporal.²

A suplementação em adultos com excesso de peso ou obesos, com mistura de isômeros de CLA (50:50), numa maioria fez não só diminuir a MCG entre os 3%-15%, como também aumentar a MMC, embora noutros estudos não tenha demonstrado alterações.^{2,3,18,35}

Num outro estudo onde também foi avaliada a possível alteração da MGC em adultos com peso normal a fazerem suplementação de CLA (50:50), foram registados resultados díspares. Por um lado, uns obtiveram a inexistência de alterações nesse parâmetro, enquanto outros reportaram uma diminuição da massa gorda entre os 4%-20%. De notar que, em alguns desses estudos que registaram a diminuição da MGC, os sujeitos estavam envolvidos em treinos físicos ao longo dos períodos de suplementação. Esse dado é relevante e deve ser tomado em conta, pois pode ser um fator de confusão.³

Alguns estudos reportaram um aumento significativo da MMG com a suplementação de CLA. Blankson et al, registou um aumento da MMC com a suplementação de CLA, apenas

no grupo que tinha aumentado o nível de treino físico ao longo do estudo. Por isso, é possível que pelo menos em parte, as alterações observadas, fossem devido ao aumento do treino físico e não apenas ao CLA.^{3,36}

Noutro ensaio clínico, homens adultos com excesso de peso e hiperlipidémia, foram suplementados com CLA durante 8 semanas e não se registaram alterações na sua composição ou PC.⁴ É necessário ter em conta a pequena amostragem deste ensaio clínico (amostra final de 27 indivíduos).

Contudo, uma meta-análise de 18 estudos concluiu que a suplementação com o CLA (50:50) numa dose de 3.2 g/dia pode vir a reduzir a massa gorda a um ritmo de 50 g/semana durante até 2 anos, tanto em homens como em mulheres.^{4,37}

Além destes estudos, Larsen et al investigou o potencial papel do CLA na prevenção da recuperação de peso corporal em indivíduos moderadamente obesos que tenham perdido aproximadamente 10 kg após uma dieta de baixas calorias durante 8 semanas.^{2,38} Com os resultados, concluíram que a suplementação da mistura de CLA durante 1 ano, não prevenia essa recuperação de PC, comparativamente ao grupo controlo.^{2,38} Curiosamente, um outro estudo realizado em sujeitos com excesso de peso, que receberam 3.2 g da mistura de CLA (50:50) durante 6 meses incluindo na época natalícia, demonstrou uma menor taxa de ganho de peso e uma redução da MGC, em comparação com o grupo controlo.³

O CLA demonstrou reduzir a gordura corporal em mulheres com peso normal. Bassaganya-Riera e tal, efetuou um estudo onde cinquenta e três mulheres saudáveis, com idade entre 23-63 anos, foram aleatoriamente designadas para a suplementação com o CLA (4,2 g/dia) ou a mesma quantidade de azeite durante 12 semanas, num ensaio duplamente-cego. A proporção de gordura corporal diminuiu (-3,8%, $p < 0,001$) no grupo tratado com CLA, com uma diferença significativa em relação ao grupo de controlo ($p = 0,050$). O PC,

IMC e PA ficaram inalterados^{18,39}. Mais recentemente, foi observada a capacidade do CLA para promover marcadas diminuições de MGC não só total, mas também regional (tronco e pernas) em mulheres.⁴

Um estudo realizado em crianças, constatou que o ganho de gordura acumulada foi atenuado durante o crescimento na pré-puberdade (6-10 anos), em crianças suplementadas com 3 g/dia de CLA (50:50).³

Numa investigação realizada em sujeitos com Diabetes Mellitus tipo 2, foi concluído que a concentração plasmática do isómero *trans*-10,*cis*-12 era inversamente proporcional ao peso corporal. Isto é sugestivo de que este é o isómero do CLA ativo em relação à mudança de peso. Esta conclusão está de acordo com a evidência nos estudos animais, que também apontam este isómero como sendo o responsável pela redução da MGC.³

Foram executados poucos estudos sobre o efeito dos alimentos naturais, derivados do leite e enriquecidos com CLA sobre a composição corporal. Em dois desses estudos não foram encontradas alterações no peso corporal. Mas, o resultado principal neles procurado não era o PC mas sim, o perfil lipídico sanguíneo. É importante notar que, a duração destes estudos foi relativamente curta (4-8 semanas) podendo ser insuficiente para mostrar alterações no PC.³

Estas contradições encontradas entre os estudos em humanos, podem ser devidas a diferenças na metodologia adotada em cada uma. É o caso de diferenças a nível do uso da combinação dos isómeros de CLA *vs* o uso de um isómero individual; da dose e duração do tratamento com CLA e o género, peso, idade e estado metabólico da população em estudo.²

Alguns autores sugeriram que a ingestão de CLA reduzia o PC através da diminuição do tamanho dos adipócitos, assim como pela modificação da diferenciação dos mesmos.⁷ São,

no entanto, vários os mecanismos que têm vindo a ser atribuídos à regulação do CLA na obesidade. Os mecanismos potenciais incluem: diminuição do consumo energético através da supressão do apetite; aumento do gasto energético; diminuição da lipogénese ou adipogénese; aumento da lipólise e da apoptose via *stress* do adipócito, inflamação e/ou resistência à insulina.^{2,8} Um dos mecanismos mais invocados é o da inibição da lipogénese⁷. Existem muitas evidências de que o CLA suprime a diferenciação dos pré-adipócitos em animais e humanos.^{2,8} Tem sido reportado que o uso de *trans*-10,*cis*-12 reduz a adipogénese e lipogénese, especialmente por atenuar a expressão do PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, LXR α e aP2.^{2,8,40} Muitos outros estudos mostraram que este isómero especificamente, não é capaz de inibir, mas consegue reverter o processo adipogénico e isto pode, em parte, ser mediado pela supressão da atividade do PPAR γ .² O PPAR γ é um fator de transcrição essencial na adipogénese que induz a expressão dos genes necessários para a aquisição e manutenção do fenótipo maduro dos adipócitos.¹⁰ Os dois isómeros têm afinidade para o PPAR γ , mas dos dois, o *trans*-10,*cis*-12 é o que tem demonstrado ser melhor ligante.¹⁰

Especula-se assim que o CLA antagoniza a atividade do PPAR γ por ativação das MAPKs como ERK, levando assim à inibição dos genes-alvo do PPAR γ .²

Uma das discrepâncias existentes entre os estudos em animais e em humanos parece ser a dose usada.² O CLA tem a sua eficácia máxima relacionada com a dose administrada. Estudos realizados comprovaram que o valor diário mais eficaz para a redução de massa gorda corporal é de aproximadamente 3,2 g/dia.^{3,21}

Em termos de duração, uns estudos dizem que quando a suplementação com CLA é feita por períodos inferiores a 6 meses, não se aprecia uma redução significativa de peso corporal.²¹ Outros afirmam que a relação entre o CLA e a perda de MGC é linear até aos 6

meses.³ A resposta ao CLA parece deixar de existir após um período longo de contínua administração (aproximadamente após dois anos).²¹

É importante realçar que, apesar dos estudos em animais terem avaliado os efeitos do CLA no ganho de peso de animais em crescimento ao longo do tempo, a maioria das investigações realizadas em humanas tendem a investigar se o CLA afeta, ou não, a perda de peso ou de gordura apenas em adultos.³

Sensibilidade à insulina

A suplementação com CLA, tem sido alvo de debate em parte devido à sua potencial influência na homeostasia da glicose e na sensibilidade à insulina.^{2,23}

Apesar de uma série de estudos indicar que o CLA atenua o desenvolvimento da intolerância à glicose e a hiperinsulinemia, uma outra série de investigações apoiam a noção de que o CLA está associado a efeitos secundários como a diminuição da sensibilidade à insulina e, mais recentemente, a resistência à insulina.²³ No entanto, em estudos anteriores de experimentação animal, o CLA comprovou poder melhorar a sensibilidade à insulina, embora estes dados tenham sido conseguidos em ratos utilizados como modelos de diabetes.^{4,11}

Por tudo isto continua em aberto a questão sobre qual dos isómeros é o responsável pela melhoria da tolerância à glicose, assim como a controvérsia à volta da segurança da suplementação com o CLA uma vez que já foi demonstrado que induziu resistência à insulina em murganhos.^{4,11} Nos roedores, ficou demonstrado que a mistura de CLA dos dois isómeros principais (50:50) ou o isómero *trans*-10,*cis*-12 melhoravam a tolerância à glicose nesses ratos.¹¹

Em homens obesos com sinais de síndrome metabólica, o isômero *trans*-10,*cis*-12 fez diminuir drasticamente a sensibilidade à insulina. Mais tarde, foi estudado o efeito do isômero *cis*-9,*trans*-11 em homens obesos e ficou registado que também este isômero iria diminuir a sensibilidade à insulina. Como os dois isômeros parecem causar uma diminuição da sensibilidade à insulina, é surpreendente que na suplementação com a mistura dos dois isômeros de CLA (50:50) esse efeito não se tenha observado.¹¹

Nos homens com excesso de peso, o CLA demonstrou também induzir resistência à insulina, possivelmente devido a um aumento das moléculas inflamatórias (PCR, TNF- α e IL-6).⁴

Perfil lipídico

As doenças cardiovasculares são, globalmente, as principais causas de morte, pelo que se torna importante a modificação dos seus fatores de risco, como é o caso dos elevados níveis de colesterol-LDL e/ou de triglicérides.³

O efeito do CLA sobre o perfil lipídico dos animais foi amplamente estudado e existem evidências do seu benefício sobre diversos marcadores metabólicos.^{1,4} Entre outras, elas sugerem que o CLA tem o potencial de modular o metabolismo dos lípidos no plasma e ter um impacto no desenvolvimento e regressão das placas ateroscleróticas induzidas por colesterol.^{3,4}

Apesar de ainda ser controverso, o isômero *trans*-10,*cis*-12 parece exercer um efeito específico no metabolismo lipídico em humanos, sugerindo assim que os efeitos cardioprotetores do CLA em animais também possam ser relevantes em humanos.¹⁸ No entanto, os resultados dos ensaios em humanos foram ambíguos.^{1,3} A maioria destes estudos utilizou CLA comercial com mistura dos dois isômeros, ou com apenas um dos isômeros purificados. É importante salientar uma das principais diferenças destes estudos em

comparação com os estudos em animais foi a dose usada, sendo esta normalmente maior nos estudos animais, do que aquela que é encontrada em dietas humanas.³

Mais recentemente, foram realizadas investigações sobre o efeito do consumo de produtos derivados do leite ricos em CLA ou naturalmente enriquecidos com este ácido, nos lípidos, em humanos.^{3,4,41,42} Também aqui, os resultados não foram consensuais.

- **Colesterol total (CT) e no c-LDL**

Na maioria dos casos, o efeito do CLA no CT é o mesmo verificado no c-LDL.¹ Nestes estudos onde foram encontrados resultados significativos, a maioria verificou efeitos desejáveis sobre estas duas variáveis, uma vez que o CLA exerceu um efeito redutor sobre ambas.¹ Porém, algumas investigações registaram um aumento significativo nos dois parâmetros.¹

Tricon et al, levou a cabo um estudo onde o objetivo seria comparar os efeitos dos dois principais isómeros sobre o CT e o c-LDL. Nos resultados sobre os parâmetros bioquímicos, ficou demonstrado que os isómeros do CLA tinham efeitos opostos. A ingestão de altas doses do isómero *cis-9,trans-11* reduziu significativamente os níveis das duas variáveis, comparando com o grupo controlo. Pelo contrário, o isómero *trans-10,cis-12* em doses baixas aumentou os níveis de CT e c-LDL e em doses altas não alterou o valor inicial dos dois parâmetros.^{1,3,18,43}

- **c-HDL**

São poucos os estudos que encontraram alterações significativas nos níveis do c-HDL. Não obstante, é preciso destacar que em praticamente todos eles, o CLA exerce um papel redutor sobre esta variável,¹ sendo o trabalho realizado por Moloney et al um dos estudos que demonstrou o aumento significativo nos níveis séricos de c-HDL após a ingestão de CLA.^{1,24}

No entanto, outras investigações demonstraram que a suplementação com quantidades iguais de dois isômeros de CLA (*cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12*) ou com o isômero *trans-10,cis-12* purificado podia reduzir os níveis do c-HDL quando comparado com o grupo placebo.^{1,44}

- **Índice aterogénico**

O índice aterogénico mostra a relação entre o CT e o c-HDL e está diretamente relacionado com o risco cardiovascular.^{1,41}

Nos estudos realizados, não foram obtidas alterações significativas neste índice. Em alguns estudos, a ingestão de CLA tinha inclusive, um efeito desfavorável.^{1,42,45}

Em alguns casos, foi estudada concomitantemente a relação entre os níveis séricos de c-LDL e c-HDL, tendo os resultados obtidos sido muito díspares. Enquanto alguns encontraram um aumento significativo deste índice, outros verificaram que o consumo de CLA levava a uma redução dessa variável.^{1,41,46}

- **Triglicédeos**

O CLA parece afetar de forma menos expressiva os níveis sanguíneos de triglicédeos (TG) do que os de colesterol.¹

Num ensaio clínico, onde homens e mulheres adultas, com ficha lipídica normal, foram suplementados durante 8 semanas com CLA, registou-se uma diminuição dos níveis plasmáticos de TG.⁴

Apenas alguns estudos revelaram resultados significativos. Enquanto os estudos iniciais demonstraram haver uma diminuição dos níveis de TG com a ingestão de CLA,

atualmente alguns estudos demonstraram que o consumo de CLA aumenta os níveis de TG plasmáticos.¹ Mais uma vez, temos disparidade de resultados.

- **Lipoproteína (a)**

A lipoproteína (a) (Lp (a)) tem sido a variável menos estudada dentro do perfil lipídico. No entanto, é a que tem demonstrado ter maior sensibilidade à ingestão de CLA, pois a grande maioria de estudos demonstra um aumento significativo desta variante com o consumo de CLA.¹

- **Resumo das propriedades do CLA no perfil lipídico**

Como se pode averiguar, os resultados são ambíguos e os potenciais efeitos benéficos do CLA sobre o perfil lipídico, em humanos, tem discrepâncias e controvérsias. Esta desconformidade entre os diferentes trabalhos de investigação, pode provavelmente ser explicada através das diferenças no plano experimental. As diferenças na dose, na composição dos isómeros usados, no placebo utilizado e na duração do estudo favorecem estas discrepâncias.^{3,4} Por outro lado, o tamanho da amostra, o sexo, o estado nutricional e fisiopatológico dos sujeitos incluídos no estudo, assim como a prática ou não de atividade física e o controlo da alimentação durante a intervenção podem influenciar os resultados obtidos.³

As vias metabólicas através das quais o CLA vai afetar o metabolismo lipídico e o tecido adiposo ainda não estão inteiramente elucidados. Pensa-se que modula o gasto energético, a apoptose, a oxidação de ácido gordos, a lipólise e a lipogénese.³

De todos os estudos efetuados, os que demonstraram ter resultados benéficos no perfil lipídico, foram os que tinham uma duração de 12 semanas e foram realizados com uma mistura de iguais quantidades dos isómeros *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12*, com doses entre

3 e 4 gramas diárias, em indivíduos sem morbidades identificadas, mas que apresentam excesso de peso ou obesidade.¹

Sistema imune

O CLA pode alterar diretamente as funções imunológicas, embora não esteja esclarecido qual dos isômeros individualmente pode atuar nos componentes do sistema imunitário.¹¹ Os efeitos do CLA sobre o sistema imune e sobre a resposta inflamatória em concreto, têm sido alvo de maior estudo em modelos animais.²¹ Através destes, tem sido registada a diminuição de efeitos adversos em alterações imunes, de respostas imunes do tipo alérgico e modulação da produção de citocinas, prostaglandinas e leucotrienos.²¹

Há evidência de que nos animais alimentados com uma mistura de CLA, a IgA, a IgG e a IgM aumentaram enquanto a IgE diminuiu. Num estudo desenvolvido por Bassaganya-Riera et al, foi reportado que o CLA pode aumentar a proliferação dos linfócitos T CD8⁺ em suínos.¹¹

Várias condições estão subjacentes ao processo inflamatório. A própria obesidade como já vimos, é reconhecida como sendo um estado de inflamação sistémica de baixo-grau ou crónica. Associada a esta patologia, a inflamação também é um processo central para outras patologias como a aterosclerose e a síndrome metabólica.³

Em estudos realizados *in vitro*, foi demonstrado também que o CLA tinha propriedades anti-inflamatórias.³ Os isômeros do CLA foram capazes de diminuir a produção dos eicosanóides, tanto *in vitro* como *in vivo*, e suprimir a libertação de citocinas pró-inflamatórias, particularmente o TNF- α , em animais.¹¹ Um outro estudo realizado, reafirmou esta propriedade anti-inflamatória, registando a associação entre o CLA (em mistura ou um dos isômeros purificado) e uma reduzida expressão dos mediadores inflamatórios como a COX-2, TNF- α e iNOS, e ainda a diminuição da produção da PGE₂, NO, IL-6 e IL-1 β nos

macrófagos dos ratos.³ Foi também reportado que o isômero *cis-9,trans-11* inibe a ativação eosinofílica, reduz a transcrição de TNF- α , IL-6 e IL-2 nas células Caco-2 e melhora a produção de IL-10 nas células dendríticas dos ratos. Tanto este isômero como o *trans-10,cis-12*, comprovaram reduzir as concentrações de PGE₂ e tromboxano B₂ nos macrófagos humanos.³ Contudo, existem evidências que a suplementação com o CLA, mais especificamente o isômero *trans-10,cis-12*, vai aumentar a concentração da PCR.⁴ Apesar disso, num dos estudos realizados com 8 semanas de suplementação com CLA isto não se verificou.⁴ É de realçar que este resultado controverso pode advir de não terem utilizado o mesmo produto no grupo em estudo e no grupo controlo.

Nos estudos em humanos, tem-se investigado o efeito do CLA (tanto as preparações comerciais como produtos lácteos naturais ricos em CLA) em vários biomarcadores de inflamação, mas os resultados não foram concisos. Enquanto alguns estudos demonstraram que não haveria alterações significativas outros, ao contrário, mostraram que haveria um aumento dos marcadores inflamatórios. Num estudo desses, foi concluído que o consumo de queijo de ovelha (naturalmente rico em CLA), diminuía a circulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-8 e TNF- α , comparativamente ao consumo de queijo de vaca.³ Em outro estudo, provou-se que o CLA para além de inibir as citocinas pró-inflamatórias, iria também aumentar as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10.^{3,47}

Uma outra investigação sugeriu que o CLA poderia beneficiar a iniciação de uma resposta específica à vacinação para a Hepatite-B. Como resultado desse ensaio clínico foi registado que 62% dos homens adultos saudáveis que receberam uma mistura de CLA (50:50), atingiram níveis protetores de anticorpos para a Hepatite-B. Um outro grupo do mesmo estudo, recebeu uma mistura de CLA (80:20, *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12* respetivamente) e destes, apenas 36% atingiram esse mesmo nível protetor. Todavia, é

desconhecido se resultados semelhantes seriam encontrados em certos grupos específicos como: idosos, imunocomprometidos e/ou com doenças autoimunes.¹¹

A suplementação com CLA foi também relacionada com a redução dos sintomas provocados pela alergia ao pólen das gramíneas, e com a melhoria da hiperresponsividade brônquica, em asmáticos.³

Porém, um estudo comprovou que em mulheres saudáveis, a suplementação com CLA não teve qualquer efeito nos parâmetros do sistema imunitário.¹¹

Em suma, as investigações dos efeitos do CLA (como suplemento ou em produtos naturalmente ricos) nos índices imunes e inflamatórios, forneceu resultados díspares, embora estes sugiram uma correlação positiva entre a suplementação com CLA e a melhoria da resposta inflamatória e imunitária.

No exercício e na força

Muitos estudos efetuados com duração superior a 6 semanas comprovaram que existia um efeito positivo nos grupos que faziam exercício e eram suplementados com CLA, em relação a pelo menos um dos marcadores em estudo (PC; MGC; MMC; massa óssea; força; marcadores imunológicos ou catabólicos) quando comparados com o grupo controle. Entretanto outros estudos demonstraram ausência de efeitos.²¹

Mais recentemente, tem sido investigada a administração conjunta de CLA com outros suplementos como por exemplo, mono-hidrato de creatina (muito usado por atletas nas suas dietas para melhorar o desempenho durante o exercício). Os resultados exibiram um aumento de massa magra, uma redução de massa gorda e um aperfeiçoamento da resistência ao treino, assim como da força.²¹

Justifica-se, portanto, que futuramente se investigue a interação do CLA com outros suplementos que estejam atualmente em uso.²¹

Torna-se necessário aprofundar melhor a relação da combinação entre o exercício e o CLA antes de se fazerem recomendações gerais acerca do seu uso. É importante examinar parâmetros como a dose ideal de CLA, bem como a duração e a intensidade do exercício. Além disso, é de extrema importância considerar as diferenças de exercício entre a população geral e os atletas.²¹

É do conhecimento geral que a prática do exercício físico e uma redução do aporte calórico são essenciais para a redução de peso, por isso, mais importante do que incentivar ao consumo aumentado de CLA, é promover todo um conjunto de hábitos de vida saudáveis, que possam ajudar a alcançar os objetivos pretendidos. Mais difícil mas bastante importante, será depois discernir qual o impacto que o CLA tem na redução corporal quando associado a esta mudança do estilo de vida, isto é, tentar esclarecer qual a percentagem da modificação corporal que corresponde aos efeitos do CLA e que percentagem diz respeito às mudanças efetuadas no estilo de vida.

Prevenção da doença cardiovascular

A doença cardiovascular é uma causa major de morte nos países desenvolvidos, e a maior parte dos eventos cardiovasculares são secundários à aterosclerose.⁴⁸ A elucidação dos efeitos antiateroscleróticos do CLA é de grande interesse, tendo em conta a alta prevalência desta patologia na população.¹⁷

O CLA tem demonstrado ter um efeito antiaterosclerótico em vários estudos em animais através da redução dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, c-LDL e pressão

arterial assim como, uma melhoria no c-HDL.^{19,21} Como um ácido gordo *trans*, o CLA pode desempenhar um papel importante na doença cardíaca. Alguns estudos animais sugerem que o isômero *cis-9,trans-11* paradoxalmente pode ter um efeito protetor em relação à aterosclerose e isso é, possivelmente, mediado pelos seus efeitos benéficos no metabolismo das lipoproteínas.¹⁹ Numa investigação realizada com ratos modelos de aterosclerose, houve evidência que os isômeros *trans-10,cis-12* e *cis-9,trans-11* têm efeitos diferentes. Enquanto o *cis-9,trans-11* reduziu significativamente a área lesionada, o *trans-10,cis-12* aumentou-a, comparativamente com o grupo controle.¹⁷ Têm sido sugeridos alguns mecanismos para o efeito do CLA nos processos aterogénicos. Entre as diferentes hipóteses está o envolvimento dos recetores ativados por proliferador de peroxissomo (PPARs), das proteínas de ligação ao elemento de resposta ao esterol (SREBPs) e/ou dessaturase do esterol CoA (SCD).²¹ Os PPARs são conhecidos por atenuarem os eventos pró-aterogénicos através da inibição da expressão de genes pró-inflamatórios.¹⁷

Baseados em estudos realizados *in vitro*, o CLA demonstrou exercer diversas ações benéficas em eventos relacionados com a aterosclerose em células vasculares endoteliais (CVE) e células do músculo liso (CML). Dentro dessas ações foram relatadas a inibição da adesão de células mononucleares a CVE e a CML, atenuação da secreção do mediador inflamatório das CVE e das CML, redução da secreção do mediador trombogénico das CVE e inibição da produção do colagénio nas CML. O fato de se observarem nestes estudos elevadas concentrações dos metabolitos do CLA nas CVE e nas CML, e por estes já terem sido reportados como tendo fortes atividades biológicas, indica-nos que os efeitos antiaterogénicos observados com o CLA, são presumivelmente mediados não só pelo CLA em si, mas também pelos seus metabolitos.^{13,17} Há ainda evidências que o CLA desempenha um papel inibitório na formação de neovasos nas placas ateroscleróticas.¹⁷

No entanto, os estudos em humanos sobre os fatores de risco cardiovascular são ainda inconclusivos.^{17,21,48} Muitos relatórios focaram a análise dos efeitos do CLA, em vários parâmetros (inflamatórios, perfil lipídico) quando associado a doenças cardiovasculares. As conclusões foram díspares, oscilando entre efeitos negativos a positivos, passando mesmo por efeitos nulos.^{17,21}

Estudos recentes mostram ainda que a suplementação com CLA ajuda muito no controlo da pressão arterial, diminuindo-a. Num dos casos, quando administrado concomitantemente com antihipertensores, nomeadamente o ramipril, foi demonstrado que o CLA melhorava os efeitos do ramipril em relação às alterações no angiotensinogénio plasmático. Um outro estudo demonstrou que o CLA teria também efeitos benéficos em mulheres grávidas, que sofrem uma melhoria significativa da sua hipertensão.²¹

Numa investigação realizada para avaliar os efeitos deste isómero no risco de enfarte miocárdico, os resultados mostraram que um aumento de *cis-9,trans-11-CLA*, estava associado a um menor risco de enfarte do miocárdio.¹⁹

Em relação a estas inconsistências dos efeitos do CLA na prevenção de doenças cardiovasculares em humanos, alguns autores adiantam que podem ser justificadas pelas diferenças do grupo populacional usado, pela fonte de CLA utilizada, pela existência de outros ácidos gordos no suplemento de CLA, além da dose utilizada e de outros fatores contributivos.^{17,21,48} Para além disto, algumas das incongruências entre os estudos humanos podem ser explicados por um estado de saúde diferente entre os elementos dos grupos de estudo, isto é, não é surpreendente que possa haver divergências nos efeitos do CLA em sujeitos obesos ou diabéticos quando estes são comparados com sujeitos saudáveis e de um peso normal.¹⁷ Assim, como muitos dos pacientes com DCV já estão medicados, é necessária a execução de estudos observacionais de longa duração para provar se o CLA tem efeito não

só nos biomarcadores cardíacos e inflamatórios, mas também a nível da saúde cardiovascular.²¹

Torna-se clara a necessidade de realização de mais estudos a longo prazo em humanos, para averiguar a aplicabilidade do CLA nos efeitos de doenças cardiovasculares,²¹ para elucidar sobre possíveis fatores de confusão (presença de outras patologias associadas como obesidade ou diabetes tipo II ou a interação com a medicação habitual do doente) e para investigar a efetividade e segurança da suplementação com o CLA.¹⁷

Saúde do osso

A saúde e funcionalidade do osso são influenciadas por vários fatores incluindo o estado nutricional, hormonas e carga mecânica. Uma das consequências de uma diminuição da renovação ou remodelação óssea é a osteoporose. Assim, é importante procurar estratégias que atenuem a diminuição da massa óssea. A maior parte das pesquisas foca-se no cálcio, vitamina D, ingestão de proteínas e vitamina K. Porém, outros nutrientes incluindo o CLA têm vindo a ser alvo de investigação devido às suas influências na massa e metabolismo ósseo.³

Em modelos animais, o CLA tem demonstrado uma melhoria da qualidade da massa óssea. Essas alterações dão-se a nível da densidade óssea, conteúdo mineral ósseo, peso seco ósseo, comprimento ósseo e no conteúdo de cálcio, magnésio ou fosfato.²¹ No entanto estes resultados não têm sido consistentes. Isto poderá ser justificado através da interação entre CLA e o cálcio da dieta.^{21,49} São vários os estudos que concluem que o CLA pode estimular a absorção do cálcio, tornando assim maior o seu conteúdo disponível para a formação óssea.³ Contudo, a maior parte destes estudos foram realizados com uma mistura dos dois isómeros de CLA. Nos poucos que examinaram a diferença entre os dois, não encontraram efeitos

diretos no osso, mas sim uma atenuação da concentração da hormona paratiroideia.^{3,50} A suplementação com o CLA em animais demonstrou ainda levar a uma diminuição da produção da PGE₂, mas os resultados eram dependentes dos níveis de concentração do CLA.³

As publicações de estudos realizados em humanos são bastante limitadas.^{3,21} Dentro dessas, umas reportaram efeitos benéficos do CLA na massa óssea, outras não acharam quaisquer benefícios na sua ingestão ou ainda, referiram mesmo efeitos adversos.^{21,51} Foi também estudado o efeito do CLA e da saúde óssea em mulheres pós-menopáusicas. Foi demonstrado que quando a ingestão de CLA era acima da média, essas mulheres tinham uma densidade mineral óssea maior do antebraço.³ Nas mulheres pós-menopáusicas que estavam a fazer suplemento de cálcio foi relatada uma melhoria na absorção de cálcio. É sugerido então que, de acordo com o que foi estudado em modelos animais, os benefícios do CLA na saúde óssea estejam relacionados com a sua interação com o cálcio.^{21,49}

Torna-se quase impossível retirar uma conclusão clara sobre a interação do CLA com o osso, uma vez que existem relativamente poucos estudos realizados em humanos, porque há uma falta de consistência nos protocolos efetuados e na medição dos metabolitos ósseos e ainda porque os tamanhos de amostra são normalmente pequenos.³

É importante a realização de mais estudos que avaliem a interação do CLA com o cálcio em humanos, uma vez que esta é a hipótese mais provável para a contribuição benéfica deste ácido gordo na saúde do osso.²¹

Efeitos adversos

Apesar do CLA ser bastante promissor, é preciso ter em conta os possíveis efeitos adversos, alguns dos quais já encontrados tanto em animais, como em humanos.

A resistência à insulina que parece ser provocada maioritariamente pelo isómero *trans*-10,*cis*-12, em alguns estudos demonstrou ainda estimular uma hipertrofia hepática.^{18,44}

É de salientar os dois casos reportados de hepatite tóxica por automedicação com CLA^{52,53}, ambos reportados em Portugal. O mais recente faz referência a uma mulher de 63 anos que após um mês de ingestão de CLA através de suplemento para diminuição do peso corporal, começou com sintomatologia de patologia hepática. Foi diagnosticada com hepatite tóxica e ao contrário do caso anterior que bastou o abandono do CLA para a regressão da sintomatologia e parâmetros analíticos normalizados, necessitou de transplante hepático.⁵²

CONCLUSÃO

Os dados disponíveis, no âmbito da experimentação animal, fazem do CLA um nutriente com muito interesse num futuro próximo. No entanto, torna-se difícil a sua extrapolação para humanos devido principalmente às diferenças nas doses utilizadas.

Convém salientar primeiramente que se deve encorajar a ingestão de CLA através de uma dieta normal e não através da suplementação.

No entanto, a dieta habitual rica em CLA nos humanos, através das carnes, leite e derivados lácteos é por si só, insuficiente para atingir os níveis propostos para as atividades biológicas que se observam nestes estudos, pelo que se pode admitir que em indivíduos sinalizados, em grupos de risco (obesos, excesso de peso, etc), ou ainda indivíduos que queiram melhores performances a nível da cultura do físico, possa ser útil fazer a suplementação.

Cada um dos isómeros do CLA apresenta alguma especificidade em relação aos seus efeitos. Assim, o isómero *trans*-10,*cis*-12 está mais associado à modificação da composição corporal, enquanto o isómero *cis*-9,*trans*-11 aparenta ser o mais potente e o mais relacionado com a propriedade anticarcinogénica do CLA. Quando se opta pela suplementação, deve-se ter em conta o isómero dominante no suplemento escolhido.

A dose recomendada de CLA está mais especificamente dirigida para as alterações ao nível da composição corporal e deve ser de 3-4 g/dia, durante 12 semanas, usando uma mistura de CLA dos dois principais isómeros (*trans*,10-*cis*-12 e *cis*-9,*trans*-11) em proporções iguais.

Em termos de segurança, a suplementação com CLA em doses de 3.5 g/dia já provou ser segura.⁴ O CLA pode assim ser ingerido nas doses propostas, mas não deve ser mantido por um longo período de tempo (aproximadamente 2 anos), uma vez que está comprovado que deixa de haver resposta a este suplemento.

Toda a suplementação deve ser enquadrada no plano alimentar individual, pelo que é necessário ter especial atenção à alimentação que os sujeitos fazem durante a investigação, para além da que é fornecida. No caso de fazerem alimentação em casa, podem ingenuamente estar a ingerir mais CLA do que aquele que é fornecido durante o estudo, se o leite, a carne e os derivados lácteos fizerem parte da sua alimentação diária. É assim de extrema importância que estudos futuros incorporem uma vigilância mais apertada dos sujeitos em estudo.

O CLA comprovou ter efeitos que podem beneficiar a saúde humana, entre os quais: a modificação da composição corporal através da diminuição do peso corporal, da massa gorda e do índice de massa corporal e aumento da massa magra; o efeito anticarcinogénico inibindo a iniciação, promoção e progressão da carcinogénese, promovendo a apoptose ou impedindo a proliferação células cancerígenas da mama, próstata e aparelho digestivo; a modificação do perfil lipídico, nomeadamente na diminuição do CT, do c-LDL e dos TG, possivelmente através de uma modulação do gasto energético, da oxidação de ácido gordos, da lipólise e da lipogénese; a diminuição de respostas imunes do tipo alérgico e da resposta inflamatória através da modulação da produção de leucotrienos, prostaglandinas e citoquinas; a diminuição da prevalência de aterosclerose, pela redução dos seus fatores de risco através do envolvimento dos PPARS, das SREBPs e da SCD; a saúde do osso através do aumento da densidade óssea, conteúdo mineral ósseo, peso seco ósseo, comprimento ósseo e conteúdo de cálcio, magnésio ou fosfato.

No entanto, não houve concordância nos resultados obtidos ao longo dos estudos. Isto pode dever-se a vários fatores ocorridos ao longo do plano experimental.

Neste contexto, são necessários mais trabalhos futuros, preferencialmente de longo prazo, que determinem até que ponto certas variantes podem alterar os resultados obtidos como: o gênero dos indivíduos; o tamanho das amostras; a existência de exercício físico durante o estudo; duração e intensidade desse exercício; estado fisiopatológico e nutricional dos sujeitos; diferentes dosagens usadas; diferentes composições do CLA administrado; existência de outros ácidos gordos na amostra fornecida; o tipo de placebo usado no grupo controle e a duração do estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor Fernando José Lopes dos Santos, meu orientador, agradeço todo o apoio, disponibilidade e profissionalismo dedicados durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus Pais, aos meus Irmãos, aos meus Sobrinhos e Cunhados, agradeço toda a paciência e apoio incondicional que me foram dados ao longo de todo o curso.

Aos meus Primos e aos meus Amigos agradeço pelo indispensável otimismo tão importante em fases críticas e que me ajudou ao longo de todo este caminho.

BIBLIOGRAFIA

1. Agueda, M., Zulet, M. Á. & Martínez, J. A. Efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre el perfil lipídico en humanos. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de nutrición*. vol 59, no 3, pp 245–252 (2009).
2. Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S. & McIntosh, M. NIH Public Access. *J. Nutr. Biochem.* vol 21, pp 171–179 (2011).
3. McCrorie, T. A., Keaveney, E. M., Wallace, J. M. W., Binns, N. & Livingstone, M. B. E. Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. *Nutrition research reviews*. vol 24, pp 206–27 (2011).
4. Joseph, S. V., Jacques, H., Mitchell, P. L., Mcleod, R. S. & Jones, P. J. H. Conjugated Linoleic Acid Supplementation for 8 Weeks Does Not Affect Body Composition , Lipid Profile , or Safety Biomarkers in Overweight , Hyperlipidemic Men. *The Journal of Nutrition*. vol 141, pp 1286-1291. (2011).
5. Mcleod, R. S., Leblanc, A. M., Langille, M. A., Mitchell, P. L. & Currie, D. L. Conjugated linoleic acids , atherosclerosis , and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. vol 79, no 6, pp 1169–1174 (2004).
6. Bocca, C., Bozzo, F., Cannito, S., Colombatto, S. & Miglietta, A. CLA reduces breast cancer cell growth and invasion through ERalpha and PI3K/Akt pathways. *Chemico-biological interactions*. vol 183, pp 187–93 (2010).
7. Onakpoya, I. J., Posadzki, P. P., Watson, L. K., Davies, L. a & Ernst, E. The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in

- overweight and obese individuals: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *European journal of nutrition*. vol 51, pp 127–34 (2012).
8. Obsen, T., Faergeman, N. J., Chung, S., Martinez, K., Gobern, S., Loreau, O., Wabitsch, M., mandrup, S. & McIntosh, M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases de novo lipid synthesis in human adipocytes. *The Journal of nutritional biochemistry*. vol **23**, pp 580–90 (2012).
 9. Meng, X., Shoemaker, S. F., McGee, S. O. & Ip, M. M. t10,c12-Conjugated linoleic acid stimulates mammary tumor progression in Her2/ErbB2 mice through activation of both proliferative and survival pathways. *Carcinogenesis*. vol 29, no 5, pp 1013–21 (2008).
 10. Miller, J. R., Siripurkpong, P., Hawes, J., Majdalawich, A., Ro, H-S. & McLeod, R.S. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *Journal of lipid research*. vol 49, pp 550–62 (2008).
 11. Churrua, I., Fernández-Quintela, A. & Portillo, M. P. Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *BioFactors (Oxford, England)* **35**, 105–11
 12. Kelley, N. S., Hubbard, N. E. & Erickson, K. L. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *The Journal of nutrition* vol 137, pp 2599–607 (2007).
 13. Ringseis, R. & Eder, K. Influence of conjugated linoleic acids on functional properties of vascular cells. *The British journal of nutrition* vol 102, pp 1099–116 (2009).

14. Lau, D. S. Y. & Archer, M. C. The 10t,12c isomer of conjugated linoleic acid inhibits fatty acid synthase expression and enzyme activity in human breast, colon, and prostate cancer cells. *Nutrition and cancer* vol 62, pp 116–21 (2010).
15. Gebauer, S. K., Chardigny, J-M., Jakobsen, M. U., Lamarche, B., Lock, A. L., Proctor, S. D. & Baer, D. J. Effects of Ruminant trans Fatty Acids on Cardiovascular Disease and Cancer : A Comprehensive Review of Epidemiological , Clinical , and Mechanistic Studies. *Adv. Nutr.* vol 2, pp 332-354 (2011).
16. Wanders, A. J., Brouwer, I. A., Siebelink, E. & Katan, M. B. Effect of a high intake of conjugated linoleic acid on lipoprotein levels in healthy human subjects. *PloS one.* vol 5, e9000 (2010).
17. Eder, K. & Ringseis, R. Metabolism and actions of conjugated linoleic acids on atherosclerosis-related events in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Molecular nutrition & food research* vol 54, pp 17–36 (2010).
18. Baddini Feitoza, A., Fernandes Pereira, A., Ferreira da Costa, N. & Gonçalves Ribeiro, B. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral* **24**, 422–8 (2009).
19. Smit, L. A., Baylin, A. & Campos, H. Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial. *Am J Clin Nutr.* vol 92, pp 34–40 (2010).
20. Ritzenthaler, K. L., McGuire, M. K., Falen, R., Shultz, T. D., Dasgupta, N. & McGuire, M. A. Estimation of Conjugated Linoleic Acid Intake by Written Dietary Food Duplicate Methodology . *The Journal of Nutrition.* vol 131, pp 1548–1554 (2001).

21. Dilzer, A. & Park, Y. Implication of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52**, 488–513 (2012).
22. Belury, M. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual review of nutrition*. vol 22, pp 505–31 (2002).
23. Schmidt, J., Liebscher, K., Merten, N., Grundmann, M., Mielenz, M., Sauerwein, H., Christiansen, E., Due-Hansen, M. E., Ulven, T., Ullrich, S., Gomeza, J., Drewke, C. & Kostenis, E. Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *The Journal of biological chemistry* vol 286, no 14, pp 11890–4 (2011).
24. Moloney, F., Toomey, S., Noone, E., Nugent, A., Allan, B., loscher, C. E. & Roche, H. M. Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue. *Diabetes*. vol 56, pp 574–82 (2007).
25. Banni, S., Carta, G-, Angioni, E., Murru, E., Scanu, P., Melis, M. P., Bauman, D. E., Fischer, S. M. & Ip, C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *Journal of lipid research*. vol 42, pp 1056–61 (2001).
26. Rastmanesh, R. An urgent need to include risk-benefit analysis in clinical trials investigating conjugated linoleic acid supplements in cancer patients. *Contemporary clinical trials*. vol 32, pp 69–73 (2011).
27. Ou, L., Ip, C., Lisafeld, B. & Ip, M. M. Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. *Biochemical and biophysical research communications*. vol 356, pp 1044–9 (2007).

28. Beppu, F., Hosokawa, M., Tanaka, L. & Ai, E. Potent inhibitory effect of trans 9, trans 11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells. *J Nutr Biochem.* vol 17, pp 830–836 (2006).
29. Knekt, P., Jarvinen, R., Seppanen, R., Pukkala, E. & Aromaa, A. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *British Journal of Cancer* vol 73, pp 687–691 (1996).
30. Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M-L., Kataja, V. & Uusitupa, M. Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutrition and cancer.* vol 38, pp 151–7 (2000).
31. Ip, M. M., McGee, S.O., Masso-Welch, P. A., Ip, C., Meng, X., Ou, L., & Shoemaker, S. F. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* vol 28, no 6, pp 1269–76 (2007).
32. Zulet, M. A., Marti, A., Parra, M. D. & Martínez, J. A. Inflammation and conjugated linoleic acid: mechanisms of action and implications for human health. *Journal of Physiology and Biochemistry.* vol 61, pp 483–494 (2005).
33. West, D. B., Blohm, F. Y., Truett, A. A. & DeLany, J. P. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *The Journal of nutrition.* vol 130, pp 2471–7 (2000).

34. West, D. B., Delany, J. P., Camet, p. M., Blohm, F., Truett, A. A. & Scimeca, J. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *The American journal of physiology*. vol 275, R667–72 (1998).
35. Gaullier, J-M., Halse, J., Hoye, K., Kristiansen, k., Fagertun, H., Vik, H. & Gudmundsen, O. Supplementation with Conjugated Linoleic Acid for 24 Months Is Well Tolerated by and Reduces Body Fat Mass in Healthy , Overweight Humans. *The Journal of Nutrition*. vol 135, pp 778–784 (2005).
36. Blankson, H. *et al.* Human Nutrition and Metabolism Conjugated Linoleic Acid Reduces Body Fat Mass in Overweight and Obese Humans 1. 2943–2948 (2000).
37. Whigham, L. D., Watras, A. C. & Schoeller, D. A. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *The American journal of clinical nutrition* vol 85, pp 1203–11 (2007).
38. Larsen, T. M., Toubro, S., Gudmundsen, O. & Astrup, A. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *The American journal of clinical nutrition*. vol 83, pp 606–12 (2006).
39. Smedman, A. EM., Gustafsson, I-B., Berglund, L. GT. & Vessby, B. O. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *The American journal of clinical nutrition*. vol 69, pp 22–9 (1999).
40. LaRosa, P. C., Riethoven, J-J. M., Chen, H., Xia, Y., Zhou, Y., Chen, M., Miner, J. & Fromm, M. E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid activates the integrated stress response pathway in adipocytes. *Physiological genomics* vol 31, pp 544–53 (2007).

41. Tricon, S., Burdge, G. C., Jones, E. L., Russel, J. J., El-Khazen, S., Moretti, E., Hall, W. L., Gerry, A. B., Leake, D. S., Grimble, R. F., Williams, C. M., Calder, P. C. and Yaqoob, P. Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-age men. *Am J Clin Nutr.* vol 83, no 4, pp 744–753 (2006).
42. Desroches, S., Chouinard, P. Y., Galibois, I., Corneau, L., Delisle, J., Lamarche, B., Couture, P. & Bergeron, N. Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men. *The American journal of clinical nutrition* vol 82, pp 309–19 (2005).
43. Tricon, S., Burdge, G. C., Kew, S., Banerjee, T., Russel, J. J., Jones, E. L., Grimble, R. F., Williams, C. M., Yaqoob, P. & Calder, P. C. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* vol 80, no 3, pp 614–620 (2004).
44. Risérus, U., Arner, P., Brismar, K. & Vessby, B. Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes care.* vol 25, pp 1516–21 (2002).
45. Tholstrup, T., Raff, M., Straarup, E. M., Lund, P., Basu, S. & Bruun, J. M. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *The Journal of nutrition* vol 138, pp 1445–51 (2008).
46. Moloney, F., Yeow, T.-P., Mullen, A., Nolan, J. J. & Roche, H. M. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with

- type 2 diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition* vol 80, pp 887–95 (2004).
47. Song, H.-J., Grant, I., Mohede, I., Sattar, N., Heys, S. D. & Wahle K. W. J. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *European journal of clinical nutrition*. vol 59, pp 508–17 (2005).
48. Nakamura, Y. K., Flintoff-Dye, N. & Omaye, S. T. Conjugated linoleic acid modulation of risk factors associated with atherosclerosis. *Nutrition & metabolism*. 5:22 (2008).
49. Park, Y. & Pariza, M. W. Cosupplementation of dietary calcium and conjugated linoleic acid (CLA) improves bone mass in mice. *Journal of food science*. vol 73, pp C556–60 (2008).
50. Weiler, H., Austin, S., Fitzpatrick-Wong, S., Nitschmann, E., Bankovic-Calic, N., Mollard, R., Aukema, H. & Ogborn, M. Conjugated linoleic acid reduces parathyroid hormone in health and in polycystic kidney disease in rats. *The American journal of clinical nutrition*. vol 79, pp 1186S–1189S (2004).
51. Racine, N. M., Watras, A. C., Carrel, A. L., Allen, D. B., McVean, J. J., Clark, R.R., O'Brien, A. R., O'Shea, M., Scott, C. E. & Schoeller, D. A. Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *American Journal of Clinical Nutrition*. vol 91, pp 1157-64. (2010).
52. Nortadas, R. & Barata, J. Fulminant hepatitis during self-medication with conjugated linoleic acid. *Annals of hepatology* vol 11, no 2, pp 265–7 (2012).

53. Ramos, R., Mascarenhas, J., Duarte, P., Vicente, C. & Casteleiro, C. Conjugated linoleic acid-induced toxic hepatitis: first case report. *Digestive diseases and sciences* vol 54, pp 1141–3 (2009).