DANIELA CAETANO GONÇALVES

**EFEITOS DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO SOBRE
PARÂMETROS DO METABOLISMO LIPÍDICO ALTERADOS PELA
CAQUEXIA**

**SÃO PAULO
2010**

DANIELA CAETANO GONÇALVES

**EFEITOS DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO SOBRE
PARÂMETROS DO METABOLISMO LIPÍDICO ALTERADOS
PELA CAQUEXIA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo; para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora:
Prof^a Dra. Marília Cerqueira Leite
Seelaender

**SÃO PAULO
2010**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Gonçalves, Daniela Caetano.

Efeitos do ácido linoleico conjugado sobre o metabolismo lipídico
na caquexia / Daniela Caetano Gonçalves. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento.
Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa:
Metabolismo lipídico e caquexia.

Versão do título para o inglês: Effects of conjugated linoleic acid
upon lipid metabolism in cachexia.

Descritores: 1. CLA (Ácido Linoleico Conjugado) 2. Caquexia 3.
Fígado 4. Metabolismo lipídico 5. Suplementação 6. Esteatose I.
Seelaender, Marília Cerqueira Leite II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em
Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB039/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Daniela Caetano Gonçalves.

Título da Tese: Efeitos do ácido linoleico conjugado sobre o metabolismo lipídico na caquexia.

Orientador(a): Marília Cerqueira Leite Seelaender.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

RESUMO

GONÇALVES, D. C. **Efeitos do Ácido Linoleico Conjugado sobre parâmetros do metabolismo lipídico alterados pela caquexia.** 116f. Tese (Doutorado em ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A caquexia é uma síndrome paraneoplásica caracterizada, dentre vários sintomas, pelo comprometimento do metabolismo lipídico, tanto em animais como em humanos. Muitos estudos relatam que a suplementação com Ácido Linoleico Conjugado (CLA) possui efeito benéfico em parâmetros do metabolismo lipídico. Este trabalho investigou os efeitos da suplementação de CLA sobre parâmetros chave do metabolismo lipídico de ratos com caquexia induzida por tumor de Walker 256. Ratos Wistar machos foram randomicamente divididos nos seguintes grupos: ratos controle (C), ratos controle suplementado com óleo de girassol (CSF), ratos controle suplementado com CLA (CCLA), ratos câncer controle (TB), ratos câncer suplementado com óleo de girassol (TBSF) e ratos câncer suplementado com CLA (TBCLA). Todos os grupos receberam 0,5ml da respectiva suplementação, de forma intragástrica, por 14 dias. O peso corporal, ingestão de ração, glicose, colesterol e triacilglicerol plasmáticos (kit enzimático), glicogênio (HASSID et al.), proteína (LOWRY) e triacilglicerol (FOLCH) hepáticos, concentração de insulina e leptina plasmáticas (radioimunoensaio), expressão gênica (PCR) das enzimas hepáticas carnitina palmitoiltransferase I and II (CPT I and II), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), liver fatty acid-binding protein (L-FABP), peroxissome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha), e apolipoproteína B (apoB), assim como o conteúdo de proteína da apoB (Western Blotting) e a atividade máxima das enzimas CPT I e II, foram medidos. O conteúdo de

gordura nos tecidos adiposos epididmal (TAE) e retroperitoneal (TARP) foram medidos como descrito por Stansbie, a proteína desses tecidos foi determinada através do método de Lowry, e IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 foram determinados por ELISA. A atividade da CPT II reduziu em todos os grupos em relação a C. A expressão gênica da MTP, apoB e FABP reduziram em todos os grupos TB, mas o TBCLA apresentou a maior redução da expressão gênica da apoB e MTP. Todos os grupos reduziram a proteína apoB em relação ao controle. TBCLA também mostrou aumento do conteúdo de triacilglicerol hepático e plasmático, assim como colesterol e glicose plasmáticos quando comparado com os grupos TB. O conteúdo de gordura no TAE diminuiu no TBCLA quando comparado ao controle, com o TBSF e com o CCLA. TB e TBCLA aumentaram o conteúdo de proteína no TAE quando comparado ao C, CCLA, CSF e TBSF. Observou-se uma diminuição da concentração de IL-1 β no CCLA quando comparado com C, entretanto TBCLA aumentou a concentração de IL-1 β em relação a C, TB e TBSF. Não foram observadas diferenças na concentração de IL-6 do TAE em CCLA quando comparado com C. TBCLA, entretanto, mostrou um aumento na concentração de IL-6 quando comparado com TB e CCLA. O TNF- α não mostrou alterações em CCLA em relação a C. O TBCLA mostrou alta concentração de TNF- α quando comparado com TB e CCLA. Nenhuma diferença foi observada no TARP. A suplementação com CLA falhou em promover o reestabelecimento do metabolismo lipídico hepático em animais portadores de tumor, não sendo recomendado seu uso na caquexia associada ao câncer.

Palavras-chave: CLA, caquexia, CPT, esteatose, metabolismo lipídico, fígado.

ABSTRACT

GONÇALVES, D. C. **Effects of Conjugated Linoleic Acid upon lipid metabolism in cachectic rats. 116f.** Ph. D. Thesis – (Histology) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Cancer Cachexia is a syndrome characterized, among many symptoms, by the disruption of lipid metabolism, both in animal models and cancer patients. Conjugated Linoleic Acid supplementation has been related with the improvement of lipid metabolism. We investigated the effects of CLA supplementation upon lipid metabolism in cachectic rats. Methods: Male Wistar rats were randomly assigned to a saline control (C), sunflower oil control (CSF), CLA control (CCLA), saline tumour-bearing rats (TB), sunflower oil tumour-bearing rats (TBSF), and CLA tumour-bearing rats (TBCLA). All groups received 0,5ml of respective supplementation, intragastrically, for 14 days. Body weight, dietary intake, plasma glucose, cholesterol and triacylglycerol, liver glycogen, protein and triacylglycerol content, plasma insulin and leptin concentration, mRNA expression of liver carnitine palmitoyltransferase I and II (CPT I and II), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), liver fatty acid-binding protein (L-FABP), peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha), and apolipoprotein B (apoB), as well as apoB protein content (Western Blotting) and the maximal activity of CPT I and II, were assessed. Fat content in EAT and RPAT was measured as described by Stansbie, protein was determined by Lowry, and IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10 were available by ELISA. Results: CPT II activity was reduced in all groups when compared with C. mRNA expression of MTP, apoB and FABP were reduced in all TB groups, but TBCLA showed greater reduction of apoB and MTP gene expression and reduction of apoB

protein content. TBCLA also showed an increase of hepatic and plasma triacylglycerol content, plasma cholesterol and glucose when compared with TB groups. Fat content in EAT decreased in TBCLA group when compared with control (C), with TBSF, and with CCLA. TB and TBCLA were increased the protein content in EAT when compared with C, CCLA, CSF and TBSF. It was observed a decreased IL-1 β concentration in CCLA when compared with C, but TBCLA enhanced IL-1 β concentration in relation to C and TB and TBSF. No differences were observed in EAT IL-6 concentration in CCLA when compared with C. TBCLA, however, showed increased IL-6 concentration when compared with TB and CCLA. TNF- α did not alter in CCLA in relation to C. TBCLA showed higher TNF- α concentration when compared with TB and CCLA. No differences were observed in RPAT. CLA fails in promote the re-establishment of hepatic lipid metabolism in tumor-bearing animals, not recommended supplement in cancer-related cachexia.

Keywords: CLA, cachexia, CPT, steatosis, lipid metabolism, liver.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AADA – Arilacetamida diacetilase

AG – Ácidos graxos

AGCL – Ácidos Graxos Cadeia Longa

AGL – Ácidos Graxos Livres

AMP – Adenosina monofosfato

apoB – Apolipoproteína B

C – grupo controle

CCLA – grupo controle suplementado com Ácido Linoleico Conjugado

CLA – Ácido Linoleico Conjugado

CoA – Coenzima A

COX 2 – Ciclooxygenase 2

CPT – Carnitina Palmitoil Transferase

CSF – grupo controle suplementado com óleo de girassol

DEPC – Dimetil Pirocarbonato

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ERK – Extracellular signal-regulated kinases

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT 4 – Transportador de glicose 4

GPD – glicerol-3-fosfato desidrogenase

HCL – Ácido Clorídrico

HDL – Lipoproteína de densidade alta

HMB – Hidroxi metilbutirato

ICT – Ingestão Calórica Total

IFN- γ – Interferon gama

IGF-1 – Insulin Grow factor 1

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IMC – Índice de Massa Corporal

KCL – Cloreto de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

LDL – Lipoproteína de densidade baixa

L-FABP – Proteína ligadora de ácidos graxos

LPL – Lipase de lipoproteína

LMP – Proteína mobilizadora de lipídios

LPS – Lipopolissacaríde

MEK – [Mitogen](#)-activated kinases

MES – Tecido Adiposo Mesentérico

M-MLV - Moloney Murine Leukemia Virus

MTP – proteína de transporte microssomal

NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NFκB – Fator Nuclear kappa B

NSAIDS – Anti inflamatórios não esteroidais

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PPAR –α – Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa

PPAR – γ - Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos gama

PIF – Fator indutor de proteólise

TAE – Tecido Adiposo Epididimal

TAG – Triacilglicerol

TARP – Tecido Adiposo Retroperitoneal

TB – Grupo tumor

TBCLA – Grupo tumor suplementado com Ácido Linoleico Conjugado

TBSF – Grupo tumor suplementado com óleo de girassol

UCP – Proteína desacopladora

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 Introdução	18
1.1 Caquexia	19
1.1.1 Caquexia associada ao cancer	19
1.1.2 Mecanismos relacionados à instauração da síndrome da caquexia no organismo hospedeiro	21
1.1.3 Alterações metabólico-energéticas relacionadas à caquexia	23
1.1.5 Papel do fígado no metabolismo lipídico na vigência da caquexia	24
1.1.6 Tratamento da caquexia	29
1.2 Ácido Linoléico Conjugado (CLA)	30
1.2.1 Biossíntese do CLA	30
1.2.2 Metabolismo do CLA	32
1.2.3 Funções do CLA em animais e humanos	32
1.2.4 CLA e alterações no metabolismo lipídico	33
1.2.4.1 Efeitos do CLA sobre tecido adiposo	33
1.2.4.2 Efeitos do CLA na lipólise	34
1.2.4.3 Efeitos do CLA na oxidação lipídica	34
1.2.4.4 Efeitos do CLA sobre concentração de lipídios séricos (triacilglicerol, colesterol e frações)	35
1.2.4.5 Efeitos do CLA sobre a concentração de Leptina	35
1.2.4.6 Efeitos do CLA sobre ingestão calórica e apetite	36
1.2.5 CLA como terapia nutricional na caquexia	36
2 Objetivos	38
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 Materiais e Métodos	40
3.1 Animais	40
3.2 Grupos experimentais	40
3.3 Suplementação	41
3.4 Injeção de células tumorais	43
3.5 Peso corporal, peso dos tecidos e ingestão alimentar	44

3.6 Avaliação da extração lipídica dos tecidos animais.....	44
3.7 Concentração plasmática de colesterol, triacilglicerol, glicose e VLDL.....	44
3.8 Concentração dos hormônios insulina e leptina.....	45
3.9 Medida da atividade máxima da carnitina Palmitoil Transferase (CPT-I) e (CPT-II) no fígado.....	45
3.9.1 Isolamento de mitocôndrias.....	45
3.9.2 Separação das frações CPT-I e II.....	45
3.9.3 Ensaio para medida da atividade máxima CPT-I e II.....	45
3.9.4 Extração da fase orgânica.....	45
3.10 Análise da expressão gênica da CPT -I e II, L-FABP, PPAR alfa, apoB e MTP.....	47
3.10.1 Procedimentos Gerais.....	47
3.10.2 Extração do RNA.....	48
3.10.3 Ensaio por RT-PCR.....	48
3.10.4 Geração de cDNA por transcrição reversa.....	49
3.10.5 Ensaio PCR tempo real.....	50
3.11 Análise da quantidade proteica da apoB por meio de Western Blotting.....	50
3.12 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático.....	51
3.13 Determinação da concentração de proteína nas amostras.....	51
3.14 Quantificação das citocinas teciduais.....	51
3.14.1 Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado.....	51
3.14.2 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).....	52
3.13 Análise estatística	53
4 Resultados	54
4.1 Peso, peso dos tecidos e consumo dietético	54
4.2 Dosagens plasmáticas.....	59
4.2.1 Concentração plasmática de colesterol, triacilglicerol e glicose.....	59
4.2.2 Concentração plasmática de insulina e leptina.....	62
4.3 Dosagens hepáticas.....	65
4.3.1 Conteúdo de gordura, glicogênio e proteínas hepáticas.....	65
4.3.2 Medida da atividade máxima das enzimas CPT I e CPT II no fígado.....	68
4.3.3 Medida da expressão gênica das enzimas CPT I e CPT II, L-FABP, PPAR- α , apoB e MTP no fígado.....	69
4.3.4 Medida do conteúdo de proteína apoB no fígado.....	74
4.4 Dosagens no tecido adiposo.....	75

4.4.1 Conteúdo de gordura dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, índice de adiposidade e relação leptina por grama de tecido adiposo.....	75
4.4.2 Conteúdo de proteína dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.....	79
4.4.3 Concentração de citocinas nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.....	81
5 Discussão	91
6 Conclusão	99
Referências bibliográficas	100

1 Introdução

O século XX foi marcado pela descoberta e implantação de diversos recursos tecnológicos responsáveis pela otimização de tempo e trabalho em diversos setores. Além disso, em alguns países como o Brasil houve importantes mudanças no setor econômico, aumentando o poder aquisitivo da população. Todas essas mudanças trouxeram facilidades e levaram a uma alteração de estilo de vida ao longo dos anos. Em contrapartida, em associação a essas mudanças, observou-se no Brasil um fenômeno denominado Transição Epidemiológica (PRATA, 1992). Esse conceito refere-se às modificações, em longo prazo, dos padrões de morbidade, invalidez e morte que caracterizam uma população específica e que, em geral, ocorrem em conjunto com outras transformações demográficas, sociais e econômicas. Na população brasileira o processo engloba a substituição, entre as primeiras causas de morte, das doenças transmissíveis (doenças infecciosas) por doenças não transmissíveis (doenças crônicas). Nos últimos anos, as doenças crônico-degenerativas mais incidentes na população brasileira, representando ainda a maior causa de morte são as doenças cardiovasculares e neoplasias (câncer) (PRATA, 1992).

O câncer é uma patologia multifatorial de etiologia complexa e difícil tratamento. É caracterizado pela proliferação celular descontrolada responsável pela formação de uma massa tumoral. Essas células possuem uma característica funcional ou metabólica diferenciada das células encontradas no hospedeiro, tornando-as mais resistentes à apoptose celular, além de possuírem uma capacidade de crescimento e divisão acentuados (revisão de MÜLLER et al., 2009). Em países ocidentais, aproximadamente 50% dos pacientes diagnosticados com câncer são curados, enquanto 50% morrem. A alta taxa de mortalidade se deve, entre outras razões, à dificuldade de tratamento da doença, que está restrita à cirurgia de remoção do tumor, quimioterapia e radioterapia (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH IN CANCER, 2002). Outro fator que contribui para o aumento da morbidade e mortalidade nos pacientes com câncer é a instauração de uma síndrome paraneoplásica denominada caquexia (TISDALE, 2009). Quando presente nesses pacientes, esta síndrome compromete a qualidade de vida, além de interferir negativamente no seu tratamento, pois além de aumentar os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia, pode levar à falha na recuperação de pacientes pós

cirúrgicos. A caquexia possui uma etiologia complexa, não tem cura, e seus mecanismos moleculares ainda não estão totalmente elucidados. É portanto, extremamente necessário o estudo de alternativas que minimizem seus efeitos que impedem o sucesso do tratamento do câncer (ARGILES et al., 2008).

1.1 Caquexia

A palavra caquexia tem origem das palavras em grego “kakos”, que significa “mau”, e “hexis”, que significa “estado” (TISDALE, 2009). Portanto, a caquexia é uma síndrome caracterizada pela má condição do organismo, estando diretamente relacionada à péssima qualidade de vida sendo responsável por um aumento significativo de morbidade e mortalidade dos pacientes (TAN et al., 2008).

A síndrome é caracterizada pela perda de peso acentuada. Esta diminuição do peso corporal não está associada somente a uma perda de massa gorda, mas também de massa magra, visto que na vigência desta síndrome há uma importante degradação proteica muscular (MC MILLAN, 2009).

Os principais sintomas correlacionados com a caquexia são anorexia, fraqueza, astenia, hipoalbumemia, hipermetabolismo, perda de peso, perda e atrofia muscular, anemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (SAINI et al, 2006). Muitos pacientes em estado terminal que padecem de doenças crônicas desenvolvem caquexia, destacando-se o câncer, infecções graves, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), insuficiência cardíaca congestiva, fibrose cística, artrite reumatóide, tuberculose e doença de Crohn e doença pulmonar obstrutiva congestiva. A caquexia atinge cerca de 80% desses pacientes em fase terminal e é responsável direta pelo óbito de aproximadamente 20% desses pacientes (BENJAMIN et al., 2008).

1.1.1 Caquexia associada ao câncer

A caquexia acomete cerca de 80% dos pacientes com câncer e é a causa de morte direta de cerca de 22% desses pacientes (SKIPWORTH et al., 2007). Observa-se uma maior prevalência desta síndrome em pacientes com câncer de pulmão, estômago, pâncreas, próstata e cólon (BARBER et al., 1999). A incidência de caquexia em pacientes

com carcinoma de pâncreas e estômago pode chegar a 85%, enquanto que em pacientes com câncer de mama é baixa, atingindo cerca de 40% (TISDALE, 2004). O início da caquexia está associado a uma redução da habilidade funcional e há uma relação direta entre o desenvolvimento da caquexia e redução da sobrevida (FEARON E MOSES, 2002). Estudos mostram que a perda de peso de aproximadamente 5% em pacientes com câncer está associada a uma taxa média de sobrevida muito inferior aos pacientes com câncer com estabilidade do peso (DEWIS et al., 1980) .

Em um estudo realizado por Wigmore et al., 1997 mostrou-se que pacientes com câncer pancreático apresentaram uma perda de peso média de cerca de 14,2% constatada no dia do diagnóstico em relação ao peso habitual relatado. Além disso, esse mesmo estudo constatou que a média de tempo de sobrevida desses pacientes a partir da data do diagnóstico da caquexia foi de apenas 4,2 meses e a perda de peso manteve-se progressiva mesmo após o diagnóstico, chegando a uma média de 24,5% de perda de peso em relação ao peso habitual, no último acesso ao paciente.

A perda de peso foi por muitos anos considerada consequência do hipermetabolismo presente em decorrência das necessidades energéticas aumentadas frente o desenvolvimento tumoral, em conjunto à anorexia, presente em alguns pacientes com câncer. A baixa ingestão calórica associada a um aumento do gasto energético do hospedeiro ocasionaria um balanço energético do organismo, levando à caquexia (BENJAMIN et al., 2008). Atualmente esta justificativa é completamente descartada, uma vez que apenas 15 a 40% dos pacientes que mostram perda de peso acentuada apresentam anorexia (diminuição da ingestão calórica) (DE WYS, 1972). Além disso, a demanda energética do tumor não é grande o suficiente para conduzir o indivíduo ao estado de “inanição”, como acreditou-se por muito tempo. Observa-se também, que um aumento no consumo energético além do necessário, na tentativa de minimizar a perda de peso é ineficaz, já que o grande problema da perda de peso não é a falta de substratos energéticos e sim a incapacidade de utilizá-los, devido a alterações do metabolismo energético (TISDALE, 2009).

Estudos mostram ainda, que o tamanho do tumor não guarda relação com a gravidade da caquexia (BARBER et al., 2000). Portanto, a instauração desta síndrome está

relacionada a mecanismos moleculares mais complexos do que os anteriormente propostos que preconizavam apenas um balanço energético negativo.

1.1.2 Mecanismos relacionados à instauração da síndrome da caquexia no organismo hospedeiro

A patogênese da perda de peso na presença da caquexia ainda não está totalmente elucidada. Entretanto sabe-se atualmente que há uma interação entre substâncias proteicas produzidas pelo tumor e substâncias pró-inflamatórias produzidas pelo hospedeiro, como citocinas e eicosanóides. Esses fatores contribuem para a alteração do perfil hormonal (glicocorticóides, catecolaminas, hormônio do crescimento, entre outros), diminuição na produção de diversos agentes anabólicos, como o IGF-1 e a insulina e comprometimento do metabolismo energético em geral, afetando o funcionamento do fígado, músculos e tecido adiposo (SKIPWORTH et al., 2007).

Os produtos produzidos pelo tumor possuem efeito direto no catabolismo proteico e lipídico do hospedeiro, auxiliando no processo de instauração da caquexia. Esses fatores incluem o fator mobilizador de lipídios (LMF), que atua diretamente no tecido adiposo liberando ácidos graxos e glicerol, através da elevação do mediador intracelular AMP cíclico, de uma forma similar aos mecanismos produzidos pelos hormônios lipolíticos naturais (TISDALE, 2008). Outro fator é o fator indutor de proteólise (PIF), que atua na degradação de proteínas miofibrilares como actina e miosina no músculo esquelético (TISDALE., 2009). Além desses fatores, algumas linhagens celulares tumorais estão associadas à expressão de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela indução de proteínas hepáticas de fase aguda (SKIPWORTH et al., 2007). Essas citocinas contribuem na imunossupressão observada e proliferação de células tumorais, remodelamento tecidual e angiogênese (SERUGA et al., 2008).

Os agentes pró-inflamatórios liberados pelo hospedeiro incluem as citocinas e as prostaglandinas. Diferentes protocolos experimentais demonstraram que as citocinas são potentes indutoras da perda de peso. Dentre esse grupo de proteínas podemos destacar: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), o interferon gama (IFN- γ), a interleucina 1 beta (IL-1 β), entre outras (SERUGA et al., 2008). Estas citocinas, quando liberadas na corrente sanguínea, são transportadas através da barreira hemato encefálica

causando um efeito supressor no apetite. A administração de citocinas pró inflamatórias em animais implica em anorexia, perda de peso, uma resposta proteica de fase aguda, catabolismo proteico e lipídico, um aumento da concentração do cortisol, glucagon e uma diminuição da concentração plasmática de insulina, resistência à insulina, anemia, febre, e gasto energético aumentado (SAINI et al, 2006).

Figura 1 : Esquema ilustrativo que mostra as principais diferenças entre a visão tradicional e a visão atual da instauração da caquexia associada ao câncer (TISDALE, 2003).

Além da presença das citocinas, muitos estudos relacionam os produtos originários do metabolismo do ácido araquidônico à caquexia (MC CARTHY, 2003). Este ácido graxo está presente em abundância nas membranas biológicas, e quando liberado pelas enzimas fosfolipases, é convertido em prostaglandinas e leucotrienos através da ação enzimática das ciclooxigenases e lipoxigenases respectivamente (TILLEY et al., 2001). As prostaglandinas, especialmente a do tipo 2 (PGE₂) são potentes mediadores parácrinos da resposta inflamatória local. Além disso, a PGE₂ pode induzir a síntese de TNF- α , IL-6 e IL-1 em macrófagos e outros tipos celulares (WILLIANS E SCHACTER, 1997). Modelos animais e estudos com humanos relataram aumento da concentração plasmática de PGE₂ na caquexia associada ao câncer (MC CARTHY, 2003).

Dessa forma, a visão atual da caquexia é de que se trata de uma síndrome de inflamação branda crônica e progressiva (ARGILES, 2008).

1.1.3 Alterações metabólico-energéticas relacionadas à caquexia

Entre os sintomas mais importantes na caquexia, destaca-se o “caos metabólico”. Uma grande variedade de mudanças relacionadas ao metabolismo energético foi descrita nos pacientes com câncer. As alterações promovidas pela síndrome da caquexia afetam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios.

Alterações no metabolismo de carboidratos: Intolerância à glicose, hiperinsulinemia, resistência à insulina, aumento do *turnover* de glicose e aumento da gliconeogênese. Além disso, a maioria dos tumores sólidos produz grandes quantidades de lactato, levando à hiperlactacidemia (TISDALE, 2009).

Alterações no metabolismo de proteínas: Aumento da excreção urinária de nitrogênio, aumento do *turnover* de proteínas, diminuição da síntese de proteínas do músculo esquelético, aumento do catabolismo das proteínas do músculo esquelético, aumento da síntese de proteínas hepáticas de fase aguda, diminuição da concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada (SAINI et al., 2006).

Alterações no metabolismo de lipídios: Aumento da lipólise, diminuição da lipogênese, hiperlipidemia, aumento do *turnover* de ácidos graxos livres, diminuição da atividade da lipase de lipoproteína, aumento da síntese *de novo* de ácidos graxos (CHEN BING e PAUL TRAYHURN, 2008).

1.1.4 Alterações no metabolismo de lipídios relacionadas à caquexia

Os lipídios possuem alto valor calórico e sua mobilização é requerida pelo aumento da demanda energética em pacientes com caquexia, havendo perda equivalente a cerca de 85% do tecido adiposo são perdidos nessas condições (CHEN BING e PAUL TRAYHURN, 2008). Esta alta mobilização lipídica originária do tecido adiposo é favorecida pelas citocinas pró-inflamatórias e pelo LMF. Apesar do aumento na mobilização lipídica, observa-se uma diminuição da remoção de triacilgliceróis plasmáticos (TISDALE, 2009). Este fato ocorre devido a uma diminuição da atividade da lipase de lipoproteínas, enzima responsável em remover o triacilglicerol presentes nas lipoproteínas séricas e permitir a captação dos ácidos graxos pelo músculo esquelético e tecido adiposo. A síndrome é também responsável por um quadro de aumento de

lipoproteínas na circulação, ou hiperlipidemia (INUI, 2002) e acúmulo de gordura no fígado (KAZANTIS et al., 2005). Essas alterações do metabolismo lipídico são tão marcadas que servem como ferramenta diagnóstica precoce, manifestando-se antes mesmo do início da perda de peso (INUI, 2002).

As alterações do metabolismo lipídico não ocorrem apenas no fígado. Em relação ao tecido adiposo, inúmeras anormalidades foram observadas na vigência da caquexia. Um estudo realizado por Bertevello et al. (2001) mostrou heterogeneidade do tecido adiposo em resposta às alterações promovidas pela inoculação do tumor de Walker 256 em ratos, clássico modelo indutor de caquexia em animais. Este estudo demonstrou que a presença do tumor modifica a composição dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais em relação ao grupo controle. Além disso, o estudo mostrou um aumento das dimensões do tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal nos grupos câncer em relação ao controle, sem haver diferenças estatísticas entre a quantidade de gordura desses depósitos. Outro estudo posterior de nosso grupo (MACHADO et al., 2004) mostrou uma infiltração de células mononucleares (macrófagos) no tecido adiposo de ratos portadores do tumor de Walker 256. Essas células infiltradas por sua vez demonstraram uma produção aumentada de TNF- α e PGE₂ em relação à produção de macrófagos peritoniais de ratos caquéticos. Tais resultados indicam a importância da participação do tecido adiposo na produção de fatores cruciais na instauração da caquexia, como citocinas e prostaglandinas. Portanto as alterações do tecido adiposo são de extrema importância para o agravamento do quadro na vigência da caquexia.

1.1.5 Papel do fígado no metabolismo lipídico na vigência da caquexia

O fígado possui importante função como gerenciador do metabolismo intermediário e fornecedor de substratos energéticos para os tecidos periféricos (SPASSIANI e KUK, 2008). Em relação ao metabolismo lipídico, o fígado é o responsável pela determinação das concentrações plasmáticas de TAG, AGL, colesterol e lipoproteínas (MCGARRY e FOSTER, 1980). O tráfego de lipídios é bidirecional, organizado sob uma série de condições fisiológicas e tem seu balanço

estabelecido pelas concentrações de lipídios que são secretados pelo fígado, captados ou liberados pelos tecidos periféricos e re-captados pelo próprio (ZAMMIT, 1996).

A gordura que chega ao fígado pode ter diferentes destinos, que serão estabelecidos pelas condições hormonais e metabólicas do indivíduo. Os lipídios podem ser estocados (GIBBONS et al., 2000), oxidados para a produção de ATP (NGUYEN et al., 2008), utilizados para a formação de corpos cetônicos (OLPIN, 2004) ou exportados para os tecidos periféricos através da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (GIBBONS, 1990), ou ainda modificadas estruturalmente.

O fígado é capaz de estocar lipídios, que podem ser originários da lipogênese, liberados pelos tecidos periféricos no sangue via lipólise na forma de ácidos graxos (AGL) e gorduras provenientes da dieta, as quais chegam ao fígado através dos quilomícrons após absorção intestinal (HAVEEL e HAMILTON, 2004). No estado pós prandial a alta concentração de insulina sérica é a principal responsável pela esterificação de ácidos graxos em TAG (DUERDEN et al., 1989). A insulina sinaliza a ativação da enzima glicerol-3-fosfato acil-transferase, responsável pelo passo inicial da síntese de TAG pelo hepatócitos, mostrando que os processos de síntese de TAG e degradação de AGCL são mediados pelo estado fisiológico do indivíduo (TOPPING e MAYES, 1982). A plasticidade hepática confere a esse órgão a função de armazenamento, com objetivo de neutralizar a toxicidade dos ácidos graxos liberados pelo tecido adiposo ou provenientes de dietas hiperlipídica (UNGER et al., 1999).

O fígado é grande consumidor de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) para geração de energia necessária para o seu próprio funcionamento (MURTHY e PANDI, 1994). A Beta-oxidação mitocondrial é a mais importante via para oxidação de AGCL e é a mais considerável partição relacionada ao metabolismo lipídico dentro do fígado. O processo o qual os ácidos graxos de cadeia longa permeiam a membrana mitocondrial é dependente de carnitina e de um complexo enzimático denominado Carnitina Palmitoil Transferase. O complexo mitocondrial CPT (CPT I, II e CACT) é o mais bem entendido complexo enzimático de membrana dessa organela celular. A capacidade da enzima CPT I em converter Acil-CoA em acilcarnitina e a catálise inversa promovida pela enzima CPT II na matriz mitocondrial resulta na efetiva

transferência da molécula de AGCL para dentro da matriz mitocondrial (ZAMITT e COSTHORPHINE, 1985). A CPT I é uma proteína integral de membrana e localiza-se na membrana externa da mitocôndria, enquanto a CPT II é uma proteína periférica ancorada no lado interno da membrana mitocondrial interna. A CPT I é sensível à inibição alostérica da molécula de malonil-CoA e tal fato torna a ação da CPT I o principal sitio de controle para formação da acilcarnitina e beta-oxidação, além de suscetível ao controle promovido pela insulina (WOELTJE et al., 1987). O Malonil-CoA é produto da reação catalisada pela acetil CoA carboxilase, enzima que utiliza acetil-CoA para síntese de ácidos graxos e é ativada pela insulina (WITTERS et al., 1988).

Figura 2: Esquema ilustrativo que demonstra a disposição das proteínas do complexo CPT ao longo da membrana mitocondrial interna e externa retirado de KERNER e HOPPEL, (2000).

A regulação da oxidação lipídica é sensivelmente influenciada pelo estado fisiológico do indivíduo. No fígado, o acetil-CoA proveniente da beta-oxidação pode ser utilizado para geração de energia ou formação de corpos cetônicos em uma série de reações do ciclo HMG-CoA, que resultam em acetoacetato ou betahidroxibutirato (MCGARRY e FOSTER, 1980). No jejum prolongado, a maior produção de corpos

cetônicos é agente protetor no organismo contra a proteólise além de fornecer substratos para geração de energia em outros órgãos (WASSERMAN et al., 1989).

O transporte de triacilglicerol e colesterol para os tecidos periféricos é realizado pelo fígado através das lipoproteínas, estruturas esféricas compostas de apolipoproteínas, triacilglicerol, fosfolípidios e colesterol (SHEPERD, 1992). O fornecimento de triacilglicerol para os tecidos extra-hepáticos ocorre através da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), sendo o tecido adiposo e o músculo esquelético os dois principais receptores (DURSTINE et al., 2002). Além da VLDL, o fígado é responsável pela síntese da lipoproteína de baixa densidade (LDL), partícula rica em colesterol e representa uma fração remanescente de VLDL (DURSTINE e THOMPSON, 2001) e a lipoproteína de alta densidade (HDL) cuja função é realizar o transporte reverso de colesterol da periferia para o fígado (STEFANIK et al., 1998). Dentre todas as lipoproteínas, a VLDL é a única totalmente sintetizada pelos hepatócitos. A partícula nascente montada e secretada pelo fígado, consiste de uma estrutura globular com diâmetro entre 25 e 75 nm sendo seu componente hidrofóbico composto de triacilglicerol e pequena quantidade de ésteres de colesterol (ALENADER et al., 1976).

A montagem da VLDL é um processo complexo que inicia-se pela mobilização dos depósitos de TAG no citoplasma do hepatócitos pela enzima arilacetamida diacetilase (AADA), seguida de posterior reesterificação dos ácidos graxos pela ação enzimática da diacilglicerol acil transferase II, no lumen do retículo endoplasmático liso, onde há formação de gotículas de TAG. O TAG é transferido para a apoB, uma proteína intralumenal necessária para produzir a partícula de VLDL intermediária, pela ação da proteína de transporte microssomal (MTP) que desempenha papel chave na montagem dessa lipoproteína (GIBBONS et al., 2004). A maturação total da VLDL é dependente da ação da fosfolipase D, enzima responsável pela transferência de grandes *droplets* de TAG, para a partícula intermediária (ASP et al., 2000). A produção e secreção da VLDL podem ser reguladas através da dieta e por fatores endócrinos (WINDMUELLER e SPAETH, 1988).

hepatócitos perivenosos estão relacionados à montagem da VLDL e processos lipogênicos (GUZMAN e CASTRO, 1989). A distribuição da enzima CPT I e II nos hepatócitos também é afetada pela caquexia (KAZANTIS et al., 2005) posto que a CPT II hepática sofre enriquecimento na zona perivenosa em relação à periportal, em relação à situação controle.

Um estudo recente realizado por LIRA et al. (2008), indicou um aumento da concentração de TAG plasmático e TAG presente na VLDL de ratos caquéticos em relação ao grupo controle. Em contrapartida, houve uma diminuição da secreção de VLDL hepática, mostrando uma possível diminuição da produção de VLDL pelo fígado de animais caquéticos. Esses resultados foram acompanhados da análise da expressão gênica da apoB e MTP, proteínas relacionadas com a montagem da VLDL, quando verificou-se uma diminuição do mRNA destas no grupo portador de tumor em relação ao grupo controle.

Esses estudos realizados (LIRA et al., 2008) demonstraram que em animais portadores de tumor, a esteatose hepática está relacionada a uma diminuição da oxidação lipídica no fígado e a uma diminuição da montagem e secreção da VLDL, levando a um maior estoque de lipídios hepáticos. Esse perfil leva ao agravamento do quadro caquético, pois o acúmulo de lipídios hepático leva à toxicidade celular, atrapalhando sua função e exacerbando o caos metabólico presente no organismo. Além disso, o fígado é impedido de obter energia de forma satisfatória para atender sua própria demanda energética, além de gastar ATP em excesso na manutenção do Ciclo de Cori, que ocorre pois a concentração de lactato sanguíneo está alto. O tumor é responsável pela liberação de altas concentrações de lactato no sangue, removidas pelo fígado que por sua vez converte o mesmo em glicose através do Ciclo de Cori, gerando um débito de ATP celular.

1.1.6 Tratamento da caquexia

A melhor forma de se tratar a caquexia é através da retirada do tumor do paciente, mas infelizmente nem sempre isso é possível, principalmente quando o tumor se encontra em local de difícil remoção, ou o paciente se encontra nos estágios mais avançados da doença apresentando metástases difusas. Tentativas de garantir o aporte calórico

necessário e tentar diminuir os efeitos catabólicos ocorridos no músculo e tecido adiposo, falham considerativamente, pois a perda de peso está relacionada à incapacidade de utilização dos substratos energéticos (MC CARTHY, 2003). A redução dos sintomas associados na caquexia tornaria o tratamento de radioterapia e quimioterapia mais eficiente e contribuiria para a melhora da qualidade de vida e sobrevida (MC MILLAN, 2009).

Os possíveis tratamentos da caquexia já testados incluem medicamentos como glicocorticóides, antiinflamatórios do tipo NSAIDS, melatonina, talidomida, canabinóides e agonistas $\beta 2$. Embora a terapia nutricional ganhe cada vez mais espaço, alguns nutrientes desempenham um papel importante, pois possuem propriedades moduladoras nos genes de proteínas do metabolismo, e desta forma sua ação não está restrita ao aumento do aporte nutricional. Neste grupo de nutragênicos, destacam-se alguns suplementos como: Antioxidantes (flavonóides, vitamina C, vitamina A, vitamina E, selênio), HMB, ácidos graxos poliinsaturados n-3 e o ácido linoleico conjugado (BOSAEUS, 2008).

1.2 Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

O Ácido Linoleico Conjugado, ou CLA, consiste, na verdade, em uma classe de isômeros posicionais e geométricos do Ácido Linoleico Octadecadienóico (STACHOWSKA et al., 2007; RISERIUS et al., 2003). Ao longo de sua cadeia carbônica, há duas ligações duplas entre carbonos, a primeira localizada entre o carbono nove e dez, e a segunda entre o carbono onze e doze, mas o número de ligações e suas posições podem variar, havendo 28 isômeros geométricos e posicionais possíveis (LI et al., 2006).

1.2.1 Biossíntese do CLA

O CLA é produzido por animais ruminantes, a partir de ácidos graxos insaturados linolênico (18:3) e linoleico (18:2), obtidos na dieta. Portanto, as fontes naturais dessa substância são produtos lácteos e carne vermelha. O processo de biossíntese do CLA

ocorre por duas transformações importantes no rúmen: hidrólise das ligações éster, que são catalizadas por lipases microbiológicas e o segundo passo, o mais importante, é a biohidrogenação do Ácido Graxo Poliinsaturado (PUFA), realizada por várias bactérias encontradas no rúmen (BAUMAN et al, 1999).

Apesar da variedade de possibilidades de isômeros geométricos do Ácido Linoleico, as formas que estão mais associadas aos seus efeitos benéficos em animais e humanos são o (18:2) cis-9, trans-11 e (18:2) trans-10, cis-12, que também são encontrados em maior abundância (PARIZA et al., 2000). A forma (18:2) c-9 t-11, foi a primeira a ser descoberta e este isômero foi batizado de Ácido Rumênico. Este é o tipo mais produzido pelos ruminantes e representa 80 a 90% da composição total de CLA da gordura do leite. Entretanto, alterações na dieta dos ruminantes, como uma dieta muito pobre em fibras pode alterar o tipo de isômeros do CLA encontrados, ocorrendo um aumento na concentração de (18:2) t-10 c-12 (BAUMAN, 1999).

A concentração do Ácido Linoleico Conjugado nos alimentos está relacionada à quantidade de gordura total do alimento, e esta concentração pode variar de 3 a 7mg/g de gordura (BROWN et al., 2001).

Figura 4: Estrutura química do Ácido Graxo Linoleico e seus principais isômeros. A – Ácido graxo octadecadienoico trans-10, cis-12; B - Ácido graxo octadecadienoico cis-9, trans-11; C - Ácido graxo octadecadienoico (Ácido Linoleico) cis-9, cis-12. Extraído de BANNI, 2002.

1.2.2 Metabolismo do CLA

A absorção intestinal do CLA é idêntica a do Ácido Linoleico. Este não sofre seletividade intestinal que possa interferir em sua biodisponibilidade, principalmente quando ingerido sob a forma de triacilglicerol (MARTIN e VALEILLE, 2002).

A incorporação do CLA no TAG hepático em ratos é similar à do Ácido Oleico, e ocorre preferencialmente nos lipídios neutros. Sua concentração é maior no tecido adiposo e mamário que no plasma e fígado. Evidências indicam que o metabolismo do CLA é similar ao do Ácido Linoleico, pois ambos produzem metabólitos similares no organismo (BANNI, 2002). Em tecidos de animais e humanos é conhecido apenas o metabolismo dos isômeros c-9, t-11 e t-10, c-12 (3). Esses sofrem primeiramente ação da delta6 desaturase, que insere uma terceira dupla ligação em sua cadeia. Em seguida, a elongase adiciona dois carbonos à sua estrutura. Por último, a delta 5 desaturase insere uma quarta dupla ligação em um dos carbonos (BANNI, 2002).

1.2.3 Funções do CLA em animais e humanos

Atualmente são descritos diversos efeitos benéficos relacionados à suplementação do CLA em animais e humanos. CHURRUCA et al (2009) relataram efeitos no tratamento do câncer, sobre o sistema imunológico, no estresse oxidativo, na aterosclerose, na formação e composição óssea, na obesidade e no diabetes. Um estudo realizado por Williams, 1997, mostrou que pode haver relação entre a suplementação do CLA e um aumento de massa magra, através da produção de prostaglandina E1 (PGE 1). O aumento deste eicosanóide levaria a um aumento da concentração de somatotropina no cérebro, acarretando um aumento na secreção do hormônio do crescimento, que é um hormônio anabólico.

O efeito mais estudado em relação à suplementação do CLA, entretanto, é a alteração do metabolismo lipídico, em várias vias bioquímicas e fisiológicas de controle, influenciando a composição corporal (SILVEIRA et al., 2007; YANAGITA e NAGAO et al., 2007; TERPSTRA et al., 2003).

1.2.4 CLA e alterações no metabolismo lipídico

O CLA atua sobre o metabolismo lipídico, alterando a composição corporal não só de animais, como também de humanos (TAKAHASHI et al., 2003; YAMASAKI et al., 2003; MIZANOOR et al., 2001). Também são relatadas alterações na concentração de lipídios no sangue, e em alguns órgãos, entre eles o fígado (BADINIE FEITOZA et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2003b; PRIORE et al., 2007). Alguns estudos mostram a efetividade do CLA na peroxidação lipídica (RAYALAM et al., 2008; THOLSTRUP et al., 2008). Entretanto verifica-se que nem todos seus isômeros estão associados a tais efeitos sobre os lipídios. O isômero Trans-10, Cis-12, parece ser mais eficiente na promoção de mudanças no tecido adiposo, agindo diretamente regulando a concentração de hormônios e enzimas relacionados ao seu metabolismo (MOON et al., 2007; RODRIGUEZ et al., 2002; BLACK et al., 2002).

1.2.4.1 Efeitos do CLA sobre tecido adiposo

As alterações provocadas pelo CLA no tecido adiposo ainda são muito controversas. Estudos com ratos mostraram redução de gordura corporal após suplementação com CLA (BROWN et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2002; YAMASAKI et al., 2003; MIZANOOR et al., 2001). Mizanoor et al. (2001) observaram em ratos uma perda de 5,2% do peso corporal após a suplementação com CLA. Takahashie et al. (2002) observaram diminuição da massa dos tecidos adiposos branco e marrom em camundongos, concomitante a mudanças na expressão gênica de proteínas reguladoras do metabolismo energético. Um estudo feito por Terpstra et al. (2003), mostrou que houve mudanças na composição corporal de camundongos, independente da forma como o CLA foi administrado (Ácidos graxos livres ou triacilgliceróis). Outros estudos mostram que a suplementação com CLA em animais não alterou a composição corporal, tanto a curto prazo (XU et al., 2003), quanto a longo prazo (DEMAREE et al., 2002; BOUTHEGOURD et al., 2002).

Pesquisas realizadas em humanos também se mostram controversas. Blankson et al. (2000) verificaram diminuição do IMC em humanos suplementados com CLA e das variáveis lipídicas no sangue. Entretanto, estudos realizados com mulheres não demonstraram mudanças na composição corporal (PETRIDOU et al., 2003).

1.2.4.2 Efeitos do CLA na lipólise

Um possível efeito do CLA no metabolismo lipídico estaria relacionado ao aumento da lipólise. Segundo estudo realizado por PARIZA et al (2001), ratos mostram um aumento significativo de glicerol livre, indicando que o CLA talvez estimule a lipólise. XU et al (2002) não verificaram aumento da concentração de glicerol livre, após suplementação de CLA por um pequeno período de tempo.

Chung et al. (2005) demonstraram pela primeira vez o mecanismo de ação do CLA na diminuição da quantidade de triacilglicerol do tecido adiposo. Esse pesquisadores mostraram que o CLA leva à ativação do fator nuclear kappa B (NFκB) de forma direta ou através da via da MEK/ERK. O NFκB é um fator nuclear responsável pelo aumento da expressão gênica de citocinas pró inflamatórias como TNF-α e IL-6, portanto o CLA teria uma função inflamatória do tecido adiposo. Essas citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela inibição do PPAR-γ, receptor nuclear responsável pelo aumento da expressão de proteínas adipogênicas, como a LPL e o GLUT 4 do tecido adiposo. Este mecanismo de ação foi posteriormente confirmado por Poirier et al. (2006) e Moon et al. (2007).

1.2.4.3 Efeitos do CLA na oxidação lipídica

Alguns autores mediram a atividade da enzima Carnitina Palmitoil Transferase-1 (CPT-I), após suplementação com CLA em animais, verificando um aumento significativo de sua atividade no fígado, assim como o aumento da expressão gênica (TAKAHASHI et al., 2003; DEGRACE et al., 2004; PRIORE et al., 2007). Este aumento pode indicar um possível incremento da β-oxidação nesses tecidos. Por outro lado, alguns estudos não confirmaram o aumento da atividade dessa enzima (WENDEL et al., 2008),

assim como o aumento da expressão gênica (PURUSHOTAM et al., 2006; KÖNIG et al., 2007).

1.2.4.4 Efeitos do CLA sobre concentração de lipídios séricos (triacilglicerol, colesterol e frações)

Em relação aos triacilgliceróis e ao colesterol sérico, a influência exercida pelo CLA também se mostra contraditória. Sakono et al (1999) mostraram diminuição das concentrações de colesterol total e de colesterol livre após suplementação com CLA em ratos. Entretanto, a concentração de TAG sofreu queda em relação ao grupo controle. Outro estudo realizado com hamsters mostrou que a concentração de colesterol diminuiu nos animais suplementados com doses acima das encontradas na literatura deste lipídio (SHER et al., 2003). A maioria dos estudos, no entanto, não mostra alterações sanguíneas de colesterolemia e trigliceridemia (MIZANOOR et al., 2001; XU et al., 2003).

1.2.4.5 Efeitos do CLA sobre a concentração de Leptina

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e age no cérebro, através de receptores hipotalâmicos (MACHADO et al., 2004). Este hormônio fornece informações sobre a posição da reserva energética do organismo, atua na regulação da sensação de fome, utilização de substrato e no balanço energético. Atua também na função reprodutiva, na angiogênese, no sistema imune, e desempenha inúmeras funções endócrinas, tanto em humanos quanto em roedores (MACHADO et al., 2004).

A maioria dos estudos mostra uma diminuição da concentração de leptina no sangue após suplementação com CLA (YAMASAKI et al., 2003; KANG et al., 2001; MEDINA et al., 2000). TAKAHASHI et al. (2002) verificaram uma diminuição da expressão de mRNA da proteína (UCP) 1, que é estimulado pela leptina, após suplementação com o CLA.

Medina et al. (2000) foram os primeiros cientistas a demonstrar uma redução da leptina circulante em humanos após a suplementação de CLA por 64 dias. Esses resultados foram confirmados em estudos posteriores com animais (BATTACHARYA et al., 2006).

1.2.4.6 Efeitos do CLA sobre ingestão calórica e apetite:

Em relação à ingestão calórica e apetite, estudos realizados em humanos não verificaram mudanças (MEDINA et al., 2000). Entretanto Kamphuis et al (2002) mostram uma relação entre indivíduos suplementados com CLA após perda de peso, e controle da ingestão calórica e apetite.

1.2.5 CLA como terapia nutricional na caquexia

Os estudos que mostram a relação entre a suplementação com CLA e uma possível melhora do quadro caquético ainda são escassos. Os poucos estudos existentes trazem a relação da suplementação com CLA em relação à prevenção da perda de massa magra ou diminuição da inflamação.

Yang et al, 2002 relacionaram a suplementação de CLA com maior ingestão de ração, menor perda de peso, e uma diminuição plasmática do TNF- α em ratos com caquexia induzida por injeção de lipopolissacaríde LPS (indutor da produção de TNF- α pelo macrófago). Um estudo atual de Larsen e Crowe (2009) demonstraram que, em células primárias de músculo humano estimuladas em co cultura com células de tumor pancreático, há aumento da expressão de genes inflamatórios (Ciclooxigenase 2, Interleucina-8 e TNF- α). As células expostas ao CLA C-9T-11 diminuíram a produção de TNF- α basal em miotubos estimulados apenas com TNF- α e atenuaram o aumento desta citocina induzido pelas células tumorais.

Em relação ao catabolismo proteico no músculo, Graves et al. (2004) mostraram que a suplementação com CLA em ratos caquéticos causa a perda de massa muscular, por uma diminuição de receptores de TNF- α no músculo gastrocnêmio. Dauchy et al. (2003) também observaram uma redução da massa muscular após suplementação com CLA.

McCarthy e Graves (2004) observaram uma diminuição da perda de massa magra em camundongos suplementados com CLA que apresentavam carcinosarcoma de pulmão. Esse efeito não foi observado nos camundongos que apresentavam melanoma.

As contradições em relação aos efeitos do CLA são inúmeras, entretanto deve-se levar em consideração alguns fatores, como a quantidade suplementada, o tempo de suplementação e o tipo de isômero utilizado, já que a maioria dos trabalhos publicados utilizou uma grande variedade deles. Apesar da grande quantidade de trabalhos relacionando a suplementação de CLA ao metabolismo lipídico, os mecanismos responsáveis pelos resultados ainda são controversos.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

A caquexia é uma síndrome responsável, entre outros sintomas, pelo comprometimento do metabolismo lipídico no fígado e tecido adiposo e tais alterações contribuem de forma significativa para o agravamento da doença neoplásica. Na literatura científica, a suplementação com o Ácido Linoleico Conjugado tem mostrado efeitos positivos sobre a modulação da expressão gênica de enzimas do metabolismo lipídico, mas seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado. Atualmente, poucos estudos foram realizados relacionando o CLA e a caquexia. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da suplementação do Ácido Linoleico Conjugado sobre parâmetros chave do metabolismo lipídico no fígado e tecido adiposo, em ratos controle e portadores de caquexia induzida pelo tumor de Walker 256.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 - Verificar peso corporal, peso dos tecidos (fígado, músculo e tecidos adiposos) e ingestão de ração
- 2 - Verificar aspectos do metabolismo intermediário no fígado:
 - Capacidade de oxidação de ácidos graxos pelo fígado através da atividade máxima e expressão gênica do complexo enzimático CPT (etapa chave da oxidação lipídica) e expressão gênica do receptor nuclear PPAR- α (modula a expressão gênica das enzimas oxidativas do metabolismo lipídico).
 - Formação da VLDL, através da expressão gênica da apoB (apolipoproteína B) e MTP (proteína de transferência de triacilglicerol microssomal) e imunodeteção protéica da apoB.
 - Esteatose hepática, através do conteúdo hepático de triacilglicerol e expressão gênica da L-FABP no fígado
 - Conteúdo de glicogênio e proteína hepáticos
- 3 – Verificar parâmetros no plasma:
 - Concentração plasmática de triacilglicerol e colesterol e glicose
 - Concentração de hormônios insulina e leptina

4 – Verificar parâmetros no tecido adiposo:

- Avaliar conteúdo de gordura (TAG) e proteína no fígado e tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal.
- Avaliar o perfil de citocinas (IL-1 β , IL-6, TGF- α e IL-10) nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal.

Para que se tenha certeza de que os resultados encontrados estiveram relacionados à suplementação com Ácido Linoleico Conjugado e não à suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ω -6, utilizou-se como uma outra forma de controle o óleo de girassol, rico em Ácido Linoleico.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais.

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), fornecidos pelo Biotério da faculdade de Medicina/USP. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do departamento de Biologia celular e do desenvolvimento (ICB/USP) em regime de fotoperíodo 12h claro:12h escuro (período claro iniciando-se às 7:00h), temperatura de 23 ± 1 °C, recebendo ração granulada comercial (NUVILAB[®] CR1- Nutrivital Nutrientes Ltda) *ad libitum*.

O sacrifício dos animais foi realizado por meio de decapitação, após quatorze dias de suplementação, precedido de jejum de 12 horas. Foram coletados imediatamente após o sacrifício o plasma e os tecidos para a realização das determinações descritas a seguir.

Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas no *Guide to the care and use of experimental animals of the Canadian Council on Animal Care* e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas - USP (certificado número: 148/2001 de 14/11/2001).

3.2 Grupos Experimentais.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Ratos não suplementados – **(C)**
- Ratos suplementados com o CLA – **(CCLA)**
- Ratos suplementados com Óleo de Girassol– **(CSF)**
- Ratos não suplementados com tumor – **(TB)**
- Ratos suplementados com o CLA com tumor – **(TBCLA)**
- Ratos suplementados com Óleo de Girassol com tumor – **(TBSF)**

3.3 Suplementação

Os grupos experimentais receberam diariamente 0,5 mL de CLA da marca EAS®, fabricado pela empresa tonalin® (grupos CLA), óleo de girassol da marca Liza®, fabricado pela Cargil® (grupos SF) ou salina (grupos C) durante um período de 14 dias, por administração intragástrica. O consumo de ração foi aferido, assim como o peso de todos os animais de dois em dois dias. O óleo de girassol foi escolhido como suplementação de um segundo grupo controle. Escolheu-se este óleo, pois ele apresenta um perfil de ácidos graxos poliinsaturados (Tabela 2), especialmente do tipo ω -6, muito similar ao CLA. Entretanto foi de suma importância nesse trabalho ter certeza de que os efeitos encontrados estavam apenas relacionados aos isômeros específicos do Ácido Linoleico presentes no CLA e não estavam relacionados à suplementação de ácidos graxos poliinsaturados ω -6.

Tabela 1: Composição de macronutrientes da ração (100g).

Macronutriente	Quantidade (gramas)
Carboidratos	53,0
Proteínas	22,0
Lipídios	4,5

* Informações cedidas pela Nuvilab®

Figura 5: Método de administração intragástrica (gavagem)

Tabela 2: Composição lipídica relativa (%) das suplementações oferecidas (CLA e óleo de girassol).

Ácidos Graxos	Óleo de girassol (liza, cargil®)	Ácido Linoleico Conjugado (EAS, tonalin®)
C16:0 – Palmítico	6,80	0,20
C18:0 – Estearico	2,96	2,54
C18:1 - Oléico	24,43	13,37
C18:2 – Linoléico (C9)	63,71	0,43
C18:2 – Linoléico conjugado (C9 T11)	0,00	39,65
C18:2 – Linoléico conjugado (T10 C12)	0,00	38,12
C18:3 – Linolênico	0,49	0,43

* As informações sobre o óleo de girassol foram retiradas de Reda e Carneiro, 2003; Informações sobre CLA retiradas de Rodriguez-Alcalá e Fontecha, 2006.

Figura 6: Carcinosarcoma de Walker 256 implantado no flanco direito

3.4 Injeção de células tumorais

As células ($2,0 \times 10^7$) do carcinosarcoma de Walker 256 foram injetadas em suspensão salina, subcutaneamente no flanco direito, como descrito por Machado et al. (2004).

3.5 Peso corporal, peso dos tecidos e ingestão alimentar

Os animais foram pesados no início e fim do período de suplementação. O fígado, músculo gastrocnêmio, tumor e tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram pesados. O consumo de ração foi aferido diariamente e estipulou-se uma média dos valores obtidos.

3.6 Avaliação da extração lipídica dos tecidos animais.

Amostras de pesos conhecidos das carcaças e tecidos (fígado, Tecido Adiposo Epididimal, Tecido Adiposo Retroperitoneal) foram analisadas para quantificação de gordura, pelo método gravimétrico, após extração lipídica conforme Folch et al. (1956). As carcaças foram pesadas e colocadas em um Becker individual de 2L. O conteúdo equivalente ao peso de cada carcaça em água foi adicionado ao Becker, e os mesmos foram tampados com papel pardo. As carcaças foram para a autoclave por uma hora. Após esfriamento, o conteúdo do Becker foi homogeneizado e retirou-se o conteúdo de 15mL como amostra. As amostras da carcaça e dos tecidos foram incubadas com KOH 30% (p/v) por 15 minutos e, a seguir, acrescidas de 3,0mL de etanol absoluto em banho maria por 2h, a 70 ° C. A fração dos lipídios neutros foi então extraída três vezes com éter de petróleo, e lavada com 2 mL de água destilada. Feito isso, as amostras foram transferidas para vials de vidro, onde após evaporação do éter de petróleo, determinou-se a massa de gordura presente por amostra, em relação a sua massa total.

3.7 Concentração plasmática de colesterol, triacilglicerol, glicose e VLDL

O sangue foi coletado em frascos com EDTA e o plasma obtido por centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm, à temperatura ambiente. A concentração plasmática de colesterol e triacilglicerol foi avaliada através de kits comerciais (Labtest®, Brazil) que empregam métodos enzimáticos. O método para obtenção dos valores de colesterol consiste no princípio da utilização da enzima colesterol esterase que hidroliza os ésteres de

colesterol presentes no soro formando colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre (presente no soro + produzido pela hidrólise) é oxidado em presença de colesterol oxidase formando coles-4-en-3-one e água oxigenada. Através da oxidação, a água oxigenada forma o composto colorido quinoneimida (reação de Trinder) (MOTTA, 2009).

Para medidas da concentração de triacilglicerol, o kit utilizado adota a enzima L- α -glicerol fosfato oxidase (GPO), que reage com o glicerol fosfato pela reação da lipase glicerol quinase. Na presença GPO e oxigênio o glicerol fosfato é oxidado para produzir diidroxiacetona fosfato e peróxido de hidrogênio. O peróxido reage com um cromogênio, com desenvolvimento de cor. O glicerol 3 fosfato produzido na reação catalisada pela glicerol quinase forma um composto colorido, formazan, proporcional ao teor de triacilglicerol. O glicerol-3-fosfato é inicialmente oxidado pelo NAD^+ em reação catalisada pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD) formando NADH, que reage com 2-p-iodofenil-3-nitrofenil-5-fenil tetrazolium pela ação da diaforase para produzir o corante formazan, o qual terá sua intensidade determinada por espectrofotometria, Beckman Coulter – modelo DU[®] 640 (MOTTA, 2009).

A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático que consiste na ação da enzima glicose oxidase produzindo peróxido de hidrogênio, que pela ação da peroxidase e em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto corado (quinoneimina) com máximo de absorção em 500 nm. A cor formada é proporcional à presença de glicose encontrada na amostra (LATOS e WOJTCZAK, 1989). Todas as quantificações utilizando kits descritas acima foram realizadas no mesmo ensaio para triacilglicerol, glicose e colesterol, com amostras em duplicatas.

3.8 Concentração dos hormônios insulina e leptina

A concentração plasmática de insulina foi determinada por RIA (radioimmunoassay) utilizando kit comercial (Coat-A-Count (DPC), Los Angeles, CA, USA). A concentração plasmática de leptina foi avaliada por RIA (radioimmunoassay) espécie específica, utilizando kits comerciais (Linco Research Inc., St. Louis, MO, USA). Ambos os métodos consistem no princípio de reação antígeno/anticorpo marcado por ^{125}I (radiação gama). A

leitura e quantificação dos hormônios foi realizada em equipamento Packard® - modelo Cobra II . Todas as amostras foram analisadas em duplicatas.

3.9 Medida da atividade máxima da carnitina Palmitoil Transferase (CPT-I) e (CPT-II) no fígado.

3.9.1 Isolamento de mitocôndrias

Utilizou-se o método descrito por Curi et al. (1988). Após a perfusão o fígado e o músculo gastrocnêmio foram removidos e então fragmentados com o auxílio de tesouras, lavados com tampão de isolamento (Manitol 220mM; sacarose 70mM; EDTA 0,1mM, pH 7,4) e homogeneizados manualmente. Estes foram filtrados com gaze e, a seguir, submetidos a duas centrifugações de baixa velocidade (1000rpm, 12 min), e duas outras de alta rotação (8000 rpm, 15 min).

3.9.2 Separação das frações CPT-I e II

A separação das frações contendo CPT-I e II foi realizada conforme metodologia de Woltje et al. (1987). As mitocôndrias isoladas foram ressuspensas em tampão (KCL 0,15mM e Tris HCL 5mM , pH 7,2), centrifugadas (17000g, 15 min) e novamente ressuspensas, agora em tampão fosfato (pH 7,5). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, sofrendo, a seguir, uma ultracentrifugação (100000g, 1h). O precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato e Tween 20 (solução 1% p/v). A mistura foi levada ao banho de gelo com agitação, por 30 min, e centrifugada (100000g, 1h). Ao final das centrifugações, foram obtidas as frações da CPT-I e II.

3.9.3 Ensaio para medida da atividade máxima CPT-I e II

Utilizou-se a técnica de Bremer (1981), adaptada por Seelaender et al. (1996). O meio de incubação foi composto por meio de ensaio correspondente a 80% do volume total (KCL 75mM, Manitol 50mM, Hepes 25 mM, EGTA 0,2mM, pH 7,3), 5% de

albumina de soro bovino livre de gordura; palmitoil CoA 42 μ M; 0,25 μ M de 3 H-metilcarnitina e 25 ou 50 μ L de fração enzimática isolada. Os controles receberam água destilada em substituição à amostra de CPT-I ou II. As amostras foram incubadas por 6 min, a 37° C.

3.9.4 Extração da fase orgânica

Utilizou-se o método de Bremer e Norum (1967) adaptado por Seelaender et al. (1996). A reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido perclórico 7% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi lavado com 2,0 mL de ácido perclórico e dissolvido em 1,6mL de água destilada deionizada. Acrescentou-se à essa solução, 1,0mL de butanol, 0,4mL de ácido perclórico 0,1mL de sulfato de amônia saturado. Uma nova centrifugação foi realizada (1500 rpm, 20 min), e a fase orgânica transferida para frascos contendo líquido de cintilação Brays. A leitura da radioatividade contida nas amostras foi realizada com o auxílio de um contador de cintilação (Hitache, C60 β). Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína.

3.10 Análise da expressão gênica da CPT –I e II, L-FABP, PPAR alfa, apoB e MTP.

3.10.1 Procedimentos Gerais

Para reduzir a presença de RNases, foram adotados os seguintes cuidados em todos os procedimentos: utilização de material esterilizado descartável; esterilização da vidraria (em forno a 250°C por 4 horas); manipulação de amostras e materiais com luvas; utilização de água tratada com dietil-pirocabonato (água Sigma-DEPC 0,01% vol/vol em 3 vezes de 200mL, sob agitação magnética por 12 horas, autoclavada) (SAMBROOK et al., 1989).

3.10.2 Extração do RNA

Para a análise da expressão gênica das proteínas CPT I, CPT II, PPAR, FABP, MTP e apoB, o RNA total do fígado, foi extraído com o reagente Trizol[®] (100mg de tecido/ml Trizol[®]), após homogeneização dos tecidos em aparelho Politron e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com cerca de 200 µl de clorofórmio e centrifugadas por 15 minutos a 12000g (4°C) para a obtenção do RNAtot (a fase superior) que foi precipitada com 500 µl de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Os *pellets*, agora visíveis, foram lavados com etanol 75% e as amostras centrifugadas por 5 minutos a 7500g, a 4°C. O álcool foi removido e os *pellets* secos à temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram solubilizadas em água-DEPC. Para avaliação da concentração e pureza do RNAtot, foram realizados ensaios espectrofotométricos sob comprimento de onda de 260 e 280 nm. A razão $A_{260/280}$ é proporcional à concentração de RNAtot na amostra (SAMBROOK et al, 1989).

3.10.3 Ensaio por RT-PCR

Remoção de DNA genômico: O RNAtotal extraído de fígado dos grupos experimentais foi colocado em presença de Deoxiribonuclease I, DNase altamente purificada, para a remoção de DNA genômico. Para tanto, o RNAtotal foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, em tubo de polipropileno juntamente com 2µl de DNase I, e 2µl de solução tampão Dnase 10X, completando com água-DEPC para 20 µl de volume total de reação. Em seguida foi bloqueada a reação com EDTA 25 mM incubado por 10 minutos a 65 ° C. O RNAtot foi seco em centrífuga a vácuo.

3.10.4 Geração de cDNA por transcrição reversa

O cDNA foi gerado pela incubação de 2µg de RNAtot na presença de 2µl de OligoDTs (0,05 µg/µl) e 2 µl de transcriptase reversa (M-MLV *Reverse Transcriptase* 20U, Gibco), completando com Água-DEPC para 20 µl de volume total de reação, por 10

minutos à 21 ° C, 30 minutos à 42 ° C e 10 minutos, em termociclador (Gene Amp®, PCR system 9700).

Os primers foram desenhados conforme sequência Genbank, representado pela tabela 3:

Tabela 3: Sequência de primers para realização do PCR Tempo Real

Proteína	Sense	Antisense
CPT I (Esser et al., 1993)	ccaagctgtggccttcagt	ggacgccgctcacaatgttc
CPT II (Woeltje et al., 1990)	gataagcagaataagcacacc	ggaggaacaaagcgaatgagt
PPAR α (NM_0131961)	cctgccttcctgtgaact	atctgctcaagtggggaga
FABP (NM_0125561)	tgggaaaggaaacctcattg	tggacccataggtgatggt
ApoB (NM_0192872)	agcgccaccaagattaactg	gcttgagctcgtagctggac
MTP (NM_0011077271)	gtcacacaactggcctctca	gccgttatcgtagcttgat
GAPDH (NM_0170083)	agacagccgcattcttctgt	cttgccgtgggtagagtcac

3.10.5 Ensaio PCR tempo real

Os resultados da concentração de mRNA foram expressos pela razão Gene alvo/GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase). Para cada amostra a amplificação foi realizada em triplicata em 25- μ l por reação, volume de 5–20 de of cDNA, 12.5 μ l Syber Green Master Mix (Applied Biosystems), e 200 nM de cada primer. A análise (PCR) foi realizada segundo os parâmetros: 50 ° C por 2 min., 95°C por 10 min., seguido de 40 ciclos de 95 ° C por 15 s, e 60 ° C por 1 min. Fluorescência foi quantificada e analisada no equipamento AB 7300 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Os resultados foram expressos usando em unidades arbitrárias e segundo método descrito pelo fabricante.

3.11 Análise da quantidade proteica da apoB por meio de Western Blotting

As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de lise e a quantidade de proteína determinada pelo método de Bradford. As amostras foram adicionadas ao marcador (4X SDS) na concentração de 90 μ g de amostra. As amostras foram submetidas

a uma temperatura de 95 ° C por 5 minutos a e em seguida as amostras foram transferidas para o gel de acrilamida e bis-acrilamida, correndo por duas horas em uma voltagem de 20mA. Após o término, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membrana de nylon (Hibond extra®) através do sistema de transferência semi seco por uma hora. A confirmação da transferência foi confirmada com ponceau na membrana (para verificar bandas). Após as lavagens com TBS +0,1% Tween, realizou-se o bloqueio com incubação de albumina por uma hora. Após o bloqueio e a novas lavagens, incubou-se a membrana com o anticorpo primário para apoB antisheep (Bristol Myers Squibb) na diluição de 1:1000 em TBS +0,1% tween, overnight. No dia seguinte, após as lavagens, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário Santa Cruz (antigoat), por duas horas. Após a incubação seguida de lavagens, revelou-se a membrana em acetato por 1 minuto com kit de ECL (GE).

As membranas foram digitalizadas e quantificou-se as bandas através do programa *Scion Image*. Utilizou-se como controle interno a proteína α -tubulina.

3.12 Determinação do conteúdo de glicogênio hepático

Método bioquímico

O conteúdo de glicogênio hepático foi determinado pelo método de Hassid et al. (1957). Os fígados foram digeridos inicialmente por 30 min para a extração do glicogênio em solução KOH 5,5M, em banho fervente. A extração final foi feita em duas etapas através da precipitação com etanol a 70%, ainda em banho fervente. Utilizando-se uma solução de antrona 1M em ácido sulfúrico (responsável pela hidrólise do glicogênio, transformando-o em glicose) determinou-se o conteúdo de glicogênio. A antrona reage com a glicose produzida, tornando a amostra esverdeada (método colorimétrico). O produto da reação foi determinado a 540nm de absorbância em espectrofotômetro (Hitachi® U-2001). Os dados foram expressos como mg de glicogênio por 100 mg de tecido.

3.13 Determinação da concentração de proteína nas amostras.

Utilizou-se o método de Lowry et al. (1951), modificado (mg/mL). As amostras foram lidas contra curva padrão de albumina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU 640) a 750nm, após adição do reagente de Folin às amostras diluídas em solução contendo Na_2CO_3 , NaOH, tartarato de sódio e potássio e sulfato de cobre. Para a determinação do conteúdo proteico nos tecidos dos animais preparou-se homogenato na proporção de 1:5 (peso/ volume).

3.14 Quantificação das citocinas teciduais

3.14.1 Determinação da concentração de proteínas totais do homogeneizado

A quantificação das proteínas totais nos tecidos avaliados foi determinada através do kit *Protein Assay-Bradford Method Biotechnology Grade* (E535, AMRESCO, Inc. USA). Este procedimento foi baseado no método colorimétrico descrito por Bradford et al. (1976), que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, que induz alteração de cor após a ligação com as proteínas desconhecidas, através da formação de um complexo que pode ser detectado por espectrofotometria de luz em comprimento de onda a 595 nm. Os valores da proteína desconhecida foram então comparados com a curva padrão de albumina (0,05 – 0,5 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$).

As amostras (diluídas em 100 vezes) e os pontos da curva foram plaqueados em triplicatas, com 10 μL por poço. Após este procedimento, acrescentou-se 190 μL de *Coomassie Brilliant Blue G-250*, diluído em 10 vezes. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Beckman Coulter, DU 640) a 595 nm. Os dados de absorbância (eixo x) foram plotados junto aos valores referentes às diferentes concentrações da curva-padrão (eixo y), e após a elaboração da curva da reta (regressão linear), os valores foram expressos em $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ de proteína tecidual (Bradford et al, 1976).

3.14.2 Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

Para dosagem das citocinas TNF- α (DY510), IL-1 β (DY501) e IL-10 (DY522) foi utilizado o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Este ensaio foi realizado em amostras homogeneizadas de acordo com o ítem (4.7), proveniente dos diferentes grupos experimentais. Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo monoclonal anti-rato IL-10, IL-1 β e ou TNF- α (anticorpo de captura) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão para lavagem (0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Posteriormente, a placa foi bloqueada para evitar ligações inespecíficas com 300 μ L de solução de bloqueio (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 μ m filtrado) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Findo este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima.

Após o bloqueio, foram adicionados 100 μ L por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 μ m filtrado), e cobertos com fita adesiva. Em dois poços foram colocados somente o reagente de diluição para caracterização do branco. A placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4).

Após as lavagens, adicionou-se 100 μ L do anticorpo de detecção (Anticorpo anti-rato IL-10, IL-1 β e ou TNF- α Biotinilado) diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, 0,2 μ m filtrado) na concentração estabelecida, cobertos com fita adesiva e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente como descrito anteriormente. Posteriormente, adicionou-se 100 μ L de Streptoavidina-HRP (1:250) por poço, que foram cobertos com papel laminado e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Findo este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito anteriormente. Posteriormente, a solução de substrato (mistura dos reagentes de cores A - H₂O₂ e B - Tetrametilbenzidina) foi adicionado na diluição de 1:1 por poço, seguido de incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, evitando-se contato direto da placa com a luz. A reação foi interrompida com 50 μ L de

H₂SO₄ 30% por poço sob agitação lenta. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek), utilizando-se filtro de 450 nm.

3.15 Análise Estatística

Os resultados foram analisados no programa ANOVA two way e comparados através do Teste de Tukey. O nível de significância adotado de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Peso corporal, peso dos tecidos e consumo de ração

Figura 7: Ganho de peso absoluto e relativo após 14 dias de suplementação. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P<0,001$ em relação a C, # $P<0,001$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 7** observa-se o ganho de peso dos ratos ao longo dos 14 dias de suplementação. Os ratos portadores de tumor (TB) apresentaram uma redução no ganho de peso em relação ao grupo controle (C) ($P < 0,01$). Esta redução também foi observada nos outros grupos com tumor suplementados (TBCLA e TBSF) em relação a seus respectivos controles (CCLA e CSF) ($P < 0,01$). Em relação ao efeito da suplementação nos animais sem tumor, observa-se que o grupo CCLA apresentou uma redução do ganho de peso, quando comparado ao controle (C) e ao grupo girassol (CSF) ($P < 0,01$). Essa redução promovida pela suplementação com CLA também foi observada nos animais portadores de tumor, em que o grupo TBCLA apresentou uma redução de ganho de peso significativa em relação aos grupos TB e TBSF ($P < 0,01$). Quando relativizou-se o ganho de peso dos ratos pelo peso inicial (**figura 8**), as mesmas alterações foram observadas.

Figura 8: Consumo diário de ração (média do consumo diário de ração). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 8$ ratos por grupo. $P > 0,05$ para todos os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A média do consumo de ração diária dos animais dos diferentes grupos não apresentou diferença estatística (**figura 8**), assim como a ingestão calórica diária (**figura 9**), mesmo nos grupos suplementados com óleo (CLA e óleo de girassol).

Figura 9: Ingestão calórica total, de carboidratos, proteínas e lipídios (em calorias). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ em relação a C. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Em relação à ingestão de macronutrientes, observa-se apenas um aumento da ingestão de lipídios nos grupos CLA e SF ($P < 0,01$), em relação aos grupos C e TB, ocorrida pela suplementação (**tabela 4**). Não houve diferença significativa em relação à ingestão de carboidratos e proteínas entre os grupos.

Tabela 4: Ingestão calórica total (ICT) e ingestão de macronutrientes diária.

Grupos	ICT (Kcal)	Carboidrato(g)	Proteína(g)	Lipídio (g)
C	80.46 ± 2.85	12.53 ± 0.75	5.20 ± 0.31	1.06 ± 0.06
TB	79.37 ± 3.04	12.35 ± 0.94	5.13 ± 0.39	1.05 ± 0.08
CCLA	73.45 ± 1.95	10.74 ± 0.30	4.45 ± 0.13	1.41 ± 0.03 * #
TBCLA	70.13 ± 2.11	10.21 ± 0.64	4.24 ± 0.27	1.37 ± 0.05 * #
CSF	73.61 ± 2.36	10.76 ± 0.68	4.47 ± 0.28	1.41 ± 0.06 * #
TBSF	78.31 ± 4.12	11.50 ± 1.11	4.77 ± 0.46	1.47 ± 0.09 * #

Resultados expressos em média ± EPM. n= 8 ratos por grupo. * P< 0,001 em relação a C, # P<0,001 em relação a TB. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O fígado, músculo gastrocnêmio, tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal e o tumor foram pesados e relativizou-se o peso em relação ao peso total do animal (**tabela 5**). Apesar da diferença de ganho de peso corporal encontrada entre os grupos, não foram observadas diferenças significativas em relação ao peso relativo dos tecidos nos diferentes grupos (P>0,05).

Tabela 5: Peso relativo do fígado, músculo gastrocnemius, tecidos adiposos e tumor.

Grupos	Fígado (%)	Músculo (%)	EAT(%)	RPAT (%)	MES (%)	Tumor (%)
C	3.00 ± 0.15	0.54 ± 0.02	0.68 ± 0.07	0.60 ± 0.07	0.61 ± 0.06	-----
TB	2.72 ± 0.49	0.42 ± 0.08	0.68 ± 0.17	0.54 ± 0.16	0.45 ± 0.13	6.55 ± 1.75
CCLA	2.83 ± 0.28	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.13	0.50 ± 0.14	0.35 ± 0.05	-----
TBCLA	3.05 ± 0.11	0.50 ± 0.02	0.60 ± 0.06	0.44 ± 0.08	0.27 ± 0.07	4.41 ± 1.14
CSF	2.81 ± 0.07	0.51 ± 0.02	0.65 ± 0.09	0.60 ± 0.05	0.49 ± 0.08	-----
TBSF	2.24 ± 0.54	0.35 ± 0.08	0.56 ± 0.15	0.49 ± 0.14	0.32 ± 0.06	4.87 ± 1.56

Resultados expressos em média ± EPM. n= 8 ratos por grupo. EAT, tecido adiposo epididimal; RPAT, tecido adiposo retroperitoneal; MES, tecido adiposo mesentérico. P> 0,05 para todos os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

4.2 Dosagens plasmáticas

4.2.1 Concentração plasmática de colesterol, triacilglicerol e glicose

Figura 10: Concentração plasmática de colesterol. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P<0,01$ em relação a C, # $P<0,001$ em relação a TBCLA, ‡ $P<0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 10** observa-se a concentração plasmática de colesterol nos diferentes grupos. Observa-se que o grupo TB apresentou um aumento significativo do colesterol plasmático em relação ao C ($P<0,01$). O mesmo fenômeno ocorre nos demais grupos TB suplementados (TBCLA e TBSF) em relação a seus respectivos controles (CCLA e CSF), aonde o TBCLA apresentou um aumento de cerca de 70% em relação ao seu controle. O grupo CCLA também apresentou aumento da concentração plasmática de colesterol em relação ao C, mas não houve diferença estatística em relação ao CSF. Nos grupos portadores de tumor, o TBCLA apresentou um aumento da concentração plasmática de colesterol em relação aos grupos TB e TBSF ($P<0,001$). O grupo CSF não apresentou

diferença significativa em relação a C, assim como o TBSF não apresentou diferença estatística em relação ao TB.

Figura 11: Concentração plasmática de triacilglicerol. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 8 ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C, # $P < 0,001$ em relação a TBCLA, $^{\square}P < 0,05$ em relação a TB, $^{\text{¥}}P < 0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A concentração plasmática de triacilglicerol dos grupos está representado na **figura 11**. Observa-se um aumento do triacilglicerol plasmático no grupo TB em relação a C ($P < 0,01$). Aumento semelhante foi encontrado nos grupos TBCLA e TBSF em relação a CCLA e CSF respectivamente ($P < 0,01$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos sem tumor C, CCLA e CSF ($P > 0,05$). Entretanto, ao comparar os grupos com tumor, observa-se aumento significativo do TBCLA ($P < 0,01$) e TBSF ($P < 0,05$) em relação ao TB. Observa-se também um aumento significativo do TBCLA em relação ao TBSF ($P < 0,05$).

Figura 12: Concentração plasmática de glicose. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 8$ ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C, # $P < 0,001$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 12**, observa-se que a concentração plasmática de glicose em TB não foi estatisticamente diferente de C ($P > 0,05$). CCLA e CSF mostraram um aumento da glicose plasmática em relação a C ($P < 0,01$), assim como o TBCLA e em relação a TB e em relação a CCLA ($P < 0,001$). TBSF não mostrou diferença significativa em relação a TB, apenas mostrou um aumento significativo em relação a C ($P < 0,01$).

4.2.2 Concentração plasmática de insulina e leptina

Figura 13: Concentração plasmática de insulina. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 8$ ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C, # $P < 0,01$ em relação a TBCLA, □ $P < 0,001$ em relação a TB. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Em relação à concentração de insulina plasmática, a **figura 13** mostra uma diminuição em TB, quando comparado a C ($P < 0,01$). Esta diminuição também foi observada no TBCLA em relação a CCLA e em relação a C. Não houve diferença significativa de TBCLA em relação a TB, mas esta queda na concentração de insulina plasmática não foi observada no TBSF em relação ao CSF e em relação a TB e TBCLA ($P < 0,01$). Os grupos CCLA e CSF não sofreram alteração significativa quando comparados com C.

Figura 14: Índice glicose/insulina. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C, # $P < 0,01$ em relação a TBCLA, □ $P < 0,001$ em relação a TB. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O índice glicose/ insulina (G/I) representado na **figura 14** mostra a concentração de glicose por cada ng de insulina secretada. Observa-se que em TB, a concentração de glicose é significativamente maior em relação a C. Observa-se um valor aproximadamente 6Xs maior em TBCLA, quando comparado a CCLA ($P < 0,001$). Esse aumento também ocorre quando comparado a TB e TBSF ($P < 0,01$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos CCLA e CSF em relação a C.

Figura 15: Concentração plasmática de leptina. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. * $P < 0,001$ em relação a C, ¥ $P < 0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A concentração plasmática de leptina está descrita na **figura 15**. O grupo TB apresentou diminuição significativa da concentração em relação a C ($P < 0,001$). Esta diminuição também foi observada em TBSF em relação a CSF ($P < 0,01$). Nos grupos controle, apenas CCLA mostrou diminuição significativa na concentração quando comparado a C e CSF ($P < 0,001$). Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos TB, TBCLA e TBSF ($P > 0,05$).

4.3 Fígado

4.3.1 Conteúdo de gordura, glicogênio e proteína hepáticos

Figura 16: Conteúdo de gordura no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P<0,001$ em relação a C, # $P<0,001$ em relação a TBCLA, □ $P<0,001$ em relação a TB, ¥ $P<0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 16** observa-se um aumento da quantidade de TAG hepático no grupo TB em relação a C. O mesmo efeito foi observado nos grupos TBCLA e TBSF em relação aos seus controles (CCLA e CSF respectivamente). Entre os grupos TB, o aumento da quantidade de TAG no fígado foi ainda significativamente maior no grupo TBCLA (33%) em relação a TB e TBSF ($P<0,001$).

Figura 17: Conteúdo de glicogênio no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P < 0,001$ em relação a C, § $P < 0,001$ em relação a CCLA, ¥ $P < 0,001$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O conteúdo de glicogênio hepático (**figura 17**) do grupo TB não foi significativamente diferente em relação a C ($P > 0,05$). Dessa forma, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos TB, TBCLA e TBSF ($P > 0,05$). Em relação aos grupos CCLA e CSF, observou-se um aumento do conteúdo de glicogênio em relação a C ($P < 0,001$) e em relação a seus respectivos grupos tumor TBCLA e TBSF ($P < 0,01$).

Figura 18: Conteúdo de proteína no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. $P>0,05$. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 18** está representado o conteúdo de proteína do fígado dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

4.3.2 Medida da atividade máxima das enzimas CPT I e CPT II no fígado

Figura 19: Atividade máxima da CPT I e CPT II no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 8$ ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

4.3.3 Medida da expressão gênica das enzimas CPT I e CPT II, L-FABP, PPAR- α , apoB e MTP no fígado.

Figura 20: Expressão gênica da CPT I e CPT II no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C, § $P < 0,01$ em relação a CCLA, ¥ $P < 0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 19**, observa-se a medida da atividade máxima de CPT I e II no fígado, não tendo sido constatadas diferenças significativas entre os grupos em relação à atividade máxima da CPT I ($P > 0,05$). Em relação à CPT II, todos os grupos mostraram

diminuição da atividade quando comparados ao controle (C) ($P<0,01$). Não foram observadas alterações significativas em relação aos grupos tumor TBCLA e TBSF em relação a seus respectivos controles CCLA e CSF.

A expressão gênica da CPT I e II está representada na **figura 20**. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à expressão gênica da CPT I ($P>0,05$). A expressão gênica da CPT II diminuiu no grupo TB em relação a C ($P<0,01$). Esta diminuição foi observada nos demais grupos TB (TBCLA e TBSF) quando comparados com seus respectivos controles CCLA e CSF ($P<0,01$). O CCLA apresentou diminuição da expressão gênica em relação a C ($P<0,01$), mas não apresentou diferenças significativas em relação a CSF. Os grupos TB (TB, TBCLA e TBSF) não apresentaram diferenças significativas entre si ($P>0,05$).

Figura 21: Expressão gênica da L-FABP no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P<0,01$ em relação a C. § $P<0,01$ em relação a CCLA, ¥ $P<0,01$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 21** ilustra a expressão gênica da L-FABP do fígado. Houve uma diminuição da expressão gênica no grupo TB em relação a C ($P<0,01$). Os grupos TBCLA e TBSF também apresentaram diminuição da expressão dessa proteína em comparação a CCLA e CSF respectivamente ($P<0,01$). Não foram observadas diferenças

estatísticas entre os grupos TB, TBCLA e TBSF, assim como entre os grupos C, CCLA e CSF ($P>0,05$).

A medida da expressão gênica do PPAR- α no fígado está representado na **figura 22**. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($P>0,05$).

Figura 22: Expressão gênica do PPAR- α no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Figura 23: Expressão gênica da apoB no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. * P< 0,01 em relação a C. # P< 0,01 em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O grupo TB apresentou uma diminuição da expressão gênica da apoB hepática, representada pela **figura 23**. O grupo TBCLA também apresentou diminuição da expressão gênica de aproximadamente 50% quando comparado a CCLA e TB e TBSF (P<0,01). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C, CCLA e CSF (P>0,05).

Figura 24: Expressão gênica da MTP no fígado. Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C. # $P < 0,01$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 24** representa a medida da expressão gênica da MTP no fígado. Observa-se uma diminuição da expressão gênica da MTP no TB em relação a C ($P < 0,01$). O grupo TBCLA também apresentou diminuição de 60% da expressão gênica em relação a CCLA ($P < 0,01$), entretanto essa diminuição foi também significativa quando comparada aos grupos TB e TBSF ($P < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os grupos C, CCLA e CSF ($P > 0,05$).

Figura 25: Imunodeteção da proteína apoB no fígado (Western Blotting). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 25**, observa-se uma diminuição da quantidade de proteína apoB hepática no grupo TB em relação ao C. Não foram observadas diferenças estatísticas entre CCLA e TBCLA, assim como em TBSF em relação a CSF ($P > 0,05$). Em relação aos grupos controle, CCLA e CSF diminuíram significativamente a proteína em relação a C. Os grupos TB (TB, TBCLA e TBSF) não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

4.4 Tecido adiposo

4.4.1 Conteúdo de gordura dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, índice de adiposidade e relação leptina por grama de tecido adiposo

Figura 26: Conteúdo de gordura do tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P<0,01$ em relação a C; § $P<0,01$ em relação a CCLA; # $P<0,01$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O conteúdo de gordura no tecido adiposo retroperitoneal (TARP) está apresentado pela **figura 26**. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos C e TB, assim como entre os grupos controle, C, CCLA e CSF ($P>0,05$). O TBCLA apresentou diminuição significativa de gordura no TARP em relação a CCLA ($P<0,01$). Este aumento também foi observado em relação aos grupos TB e TBSF ($P<0,01$). Não foram observadas diferenças de TBSF em relação ao seu controle CSF ($P>0,05$).

Figura 27: Conteúdo de gordura do tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 8 ratos por grupo. * $P < 0,01$ em relação a C; § $P < 0,01$ em relação a CCLA; # $P < 0,01$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 27** mostra o conteúdo de gordura do tecido adiposo epididimal (TAE). Os resultados encontrados foram similares aos encontrados no TARP. O TB não apresentou diferença estatística em relação ao C ($P > 0,05$). O TBCLA apresentou diminuição significativa do conteúdo de gordura no TAE de 30% quando comparado ao CCLA e TB ($P < 0,01$). Os grupos controle não mostraram diferenças estatísticas entre si (C, CCLA e CSF) ($P > 0,05$). O grupo TBSF não sofreu alterações significativas em relação a CSF ($P > 0,05$).

Figura 28: Índice de adiposidade (soma dos tecidos epididimal, mesentérico e retroperitoneal). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=8$ ratos por grupo. * $P<0,001$ em relação a C, § $P<0,001$ em relação a CCLA, # $P<0,01$ em relação a TBCLA, □ $P<0,001$ em relação a TB. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O índice de adiposidade representa a soma dos 3 depósitos de gordura mais relevantes: o tecido adiposo retroperitoneal (TARP) o epididimal (TAE) e o mesentérico (MES). A soma dos depósitos de gordura está representado na **figura 28**. Observa-se diminuição do índice de adiposidade no grupo TB em relação ao C ($P<0,01$). Nos grupos controle, houve uma diminuição no CCLA em relação a C e CSF ($P<0,001$). TBSF não mostrou diferença significativa em relação a CSF ($P>0,05$). Em relação aos grupos com tumor, TB e TBCLA mostraram uma diminuição significativa em relação a TBSF ($P<0,001$).

Figura 29: Secreção plasmática de leptina por grama de tecido adiposo (concentração de leptina dividida pela soma dos tecidos epididimal, mesentérico e retroperitoneal). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos por grupo. # $P < 0,05$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O índice leptina/IA indica a secreção de leptina por grama de tecido adiposo e está representado na **figura 29**. Não foram observadas diferenças significativas no grupo TB em relação a C ($P > 0,05$). O grupo TBCLA apresentou um aumento significativo em comparação a CCLA ($P < 0,05$). Os grupos C, CCLA e CSF não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($P > 0,05$). Nos grupos com tumor, observa-se aumento significativo de TBCLA em relação a TB e TBSF ($P < 0,05$).

4.4.3 Conteúdo de proteína dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal

Figura 30: Conteúdo de proteína do tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ em relação a C, § $P < 0,05$ em relação a CCLA, ¥ $P < 0,05$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O conteúdo de proteína do TAE ilustrado na **figura 30**, aumentou no grupo TB em relação a C ($P < 0,05$). O TBCLA também apresentou um aumento no conteúdo de proteína nesse depósito, quando comparado a CCLA ($P < 0,05$). Os grupos C, CCLA e CSF, quando comparados, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Nos grupos tumor, TB e TBCLA apresentaram aumento do conteúdo proteico em relação a TBSF ($P < 0,05$).

Figura 31: Conteúdo de proteína do tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 31** mostra o conteúdo de proteína do tecido adiposo retroperitoneal (TARP) dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

4.4.4 Concentração de citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-2) nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal

Figura 32: Concentração de IL-1 β no tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. * P< 0,05 em relação a C, □ P< 0,05 em relação a TB, # P<0,05 em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

O grupo TB não apresentou diferenças estatísticas em relação a C quanto a concentração de IL-1 β no TAE, representado pela **figura 32**. O TBCLA apresentou um valor 4Xs maior da concentração de IL-1 β no TAE em comparação a CCLA (P<0,05). Nos grupos controle, CSF mostrou aumento significativo quando comparados a C e CCLA (P<0,05). Nos grupos com tumor, a concentração em TBSF foi significativamente maior quando comparada a TB (P<0,05) e TBCLA apresentou uma concentração estatisticamente maior em relação a TB e TBSF (P<0,05). Não houve diferença significativa entre CSF e TBSF (P>0,05).

Figura 33: Concentração de IL-1 β no tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. n= 5 ratos por grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 33** ilustra a concentração de IL-1 β do tecido adiposo retroperitoneal (TARP) dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 34: Concentração de IL-6 no tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P<0,05$ em relação a C, $^x P<0,05$ em relação a TB, $^§ P<0,05$ em relação a CCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A concentração de IL-6 no TAE (**figura 34**) não foi diferente entre os grupos C e TB ($P>0,05$). O grupo TBCLA apresentou aumento significativo de 120% na concentração de IL-6 quando comparado a CCLA ($P<0,05$). A concentração de IL-6 no TAE do grupo TBSF não apresentou alteração significativa em comparação à CSF ($P>0,05$). Nos grupos controle, CSF demonstrou aumento significativo em comparação a C e CCLA ($P<0,05$). Nos grupos tumor, TBSF teve sua concentração aumentada de forma significativa em relação a TB ($P<0,05$) e TBCLA demonstrou aumento significativo quando comparado a TB e TBSF ($P<0,05$).

Figura 35: Concentração de IL-6 no tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 35** mostra a concentração de IL-6 do tecido adiposo retroperitoneal (TARP) dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

Figura 36: Concentração de TNF- α no tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P<0,05$ em relação a C, $\square$ $P<0,05$ em relação a TB, $\S$ $P<0,05$ em relação a CCLA, $\#$ $P<0,05$ em relação a TBCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A concentração de TNF- α no TAE do TB não foi estatisticamente diferente a do grupo C (**figura 36**). O TBCLA apresentou aumento significativo (3Xs maior) da concentração de TNF- α em relação a CCLA ($P<0,05$). O grupo TBSF não apresentou diferença estatística em relação a CSF ($P>0,05$). Nos grupos controle, CCLA mostrou diminuição significativa da concentração em relação a CSF ($P<0,05$), mas não houve diferença entre C ($P>0,05$). Nos grupos com tumor, TBCLA apresentou aumento significativo quando comparado a TB e TBSF ($P<0,05$). Os grupos TB e TBSF não apresentaram diferença estatística ($P>0,05$).

Figura 37: Concentração de TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A **figura 37** representa a concentração de TNF- α do tecido adiposo retroperitoneal (TARP) dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P>0,05$).

Figura 38: Concentração de IL-10 no tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ em relação a C, $^{\square}$ $P < 0,05$ em relação a TB, § $P < 0,05$ em relação a CCLA. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na concentração de IL-10 do TAE (**figura 38**), TB não foi diferente de C ($P > 0,05$). O TBCLA apresentou aumento significativo em relação a CCLA ($P < 0,05$). O grupo TBSF não diferiu de forma significativa do CSF ($P > 0,05$). Nos grupos controle, CCLA mostrou aumento significativo quando comparado a C ($P < 0,05$), mas não foram observadas diferenças estatísticas quando comparado a CSF ($P > 0,05$). Nos grupos tumor, TBCLA e TBSF apresentaram aumento significativo em relação a TB ($P < 0,05$), entretanto não mostraram diferença estatística entre si ($P > 0,05$).

Figura 39: Concentração de IL-10 no tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ em relação a C, $^{\square} P < 0,05$ em relação a TB. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A concentração de IL-10 no TARP (**figura 39**) mostrou-se significativamente diminuída no TB em relação a C ($P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos TBCLA e CCLA ($P > 0,05$). O grupo TBSF também não apresentou diferença significativa em relação a CSF ($P > 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos C, CCLA e CSF ($P > 0,05$). Nos grupos tumor, TB mostrou uma diminuição significativa quando comparado a TBCLA e TBSF ($P < 0,05$).

Figura 40: Balanço da concentração de IL-10/TNF- α no tecido adiposo epididimal (TAE). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n = 5$ ratos por grupo. * $P < 0,05$ em relação a C, § $P < 0,05$ em relação a CSF. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

A relação IL-10/TNF- α representada na **figura 40** mostra a quantidade da interleucina 10, citocina antiinflamatória, em relação a citocina pró inflamatória TNF- α . Não foram observadas diferenças significativas em TB, quando comparado a C ($P > 0,05$). O grupo TBCLA também não demonstrou diferença estatística em relação CCLA ($P > 0,05$), assim como o TBSF em relação ao CSF ($P > 0,05$). Nos grupos controle, CCLA apresentou uma diminuição da concentração quando comparado a C e CSF ($P < 0,05$). Nos grupos tumor, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos TB, TBCLA e TBSF ($P > 0,05$).

Figura 41: Balanço da concentração de IL-10/TNF- α no tecido adiposo retroperitoneal (TARP). Resultados expressos em média $\pm$ EPM. $n=5$ ratos por grupo. * $P<0,05$ em relação a C. C (controle), TB (tumor), CCLA (controle suplementado com CLA), TBCLA (tumor suplementado com CLA), CSF (controle suplementado com óleo de girassol), TBSF (tumor suplementado com óleo de girassol).

Na **figura 41**, o balanço IL-10/TNF- α do grupo TB está significativamente diminuído em relação ao grupo C ($P<0,05$). O grupo TBCLA não apresentou diferenças estatísticas em relação a CCLA, assim como o grupo TBSF em relação a CSF ($P>0,05$). Nos grupos controle, não foram observadas diferenças significativas entre C, CCLA e CSF ($P>0,05$). Nos grupos com tumor, não houve diferença estatística entre TB, TBCLA e TBSF ($P>0,05$).

5 Discussão

A caquexia é uma síndrome caracterizada pela acentuada perda de peso em indivíduos com câncer e é a principal causa de óbito nesses pacientes. Os principais sintomas correlacionados com a caquexia são anorexia, fraqueza, astenia, hipoalbumemia, hipermetabolismo, perda de peso, perda e atrofia muscular, anemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (SAINI et al, 2006). Os mecanismos responsáveis tanto pela sua instauração no organismo hospedeiro como pelo agravamento do estado de saúde ainda não estão completamente elucidados e a terapia ainda é desconhecida. Entretanto os estudos apontam para uma interação entre possíveis substâncias proteicas produzidas pelo tumor e substâncias pró-inflamatórias produzidas pelo hospedeiro, como citocinas e eicosanóides. Esse perfil inflamatório seria um dos fatores responsáveis pela alteração do perfil hormonal, como insulina, cortisol, catecolaminas, entre outros. Esse comprometimento do metabolismo energético afeta o funcionamento do fígado, músculos e tecido adiposo (SKIPWORTH et al., 2007).

Sabe-se que na vigência da caquexia ocorre um comprometimento do metabolismo energético de carboidratos, proteínas e lipídios, responsáveis não apenas pela instauração da síndrome, mas também pelo agravamento do quadro (ARGILES, 2008). Dentre as alterações no metabolismo lipídico, destacam-se a esteatose hepática e o aumento da concentração dos lipídios séricos (TISDALE, 2009). Estudos previamente realizados pelo nosso laboratório demonstraram uma capacidade reduzida pelo fígado de oxidação de gordura (SEELAENDER et al., 1996) e produção da VLDL, a lipoproteína de muito baixa densidade (LIRA et al., 2008), resultando em esteatose hepática. Além disso, ocorre uma incapacidade de captação dos lipídios séricos pelo tecido muscular, levando à hiperlipidemias (TISDALE, 2009).

Além das alterações do metabolismo lipídico no fígado, ocorre também um importante comprometimento da função do tecido adiposo. Outros estudos realizados pelo nosso grupo comprovam tais alterações, como o realizado por BERTVELLO et al. (2001) demonstrando alterações na composição dos ácidos graxos do tecido adiposo dos animais portadores de tumor em relação ao grupo controle. Esse mesmo estudo relatou aumento das dimensões do tecido adiposo mesentérico e retroperitoneal nos grupos câncer em relação ao controle, sem alteração da quantidade de gordura desses depósitos.

Outro estudo realizado posteriormente pelo nosso grupo (MACHADO et al., 2004) apontou uma infiltração de macrófagos no tecido adiposo de ratos caquéticos, responsáveis pelo aumento da produção de TNF- α e PGE₂ em relação à produção de macrófagos peritoniais desses mesmos ratos. Portanto as alterações do tecido adiposo também são cruciais para o agravamento do da caquexia.

Essas marcadas alterações são importantes para o diagnóstico precoce da instauração da síndrome, além de serem responsáveis pelo agravamento do quadro, caracterizando o “caos metabólico”. Desta forma, sabe-se que terapias que visam apenas aumentar o aporte calórico do indivíduo são incapazes de abrandar os seus sintomas, pois no indivíduo caquético a perda de peso não ocorre pela falta de nutrientes, mas sim pela incapacidade desse organismo de utilizá-los. Portanto, se faz necessário a utilização de uma terapia nutricional que tenha como intuito a modulação da expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico, na tentativa de reverter as alterações metabólicas presentes.

O metabolismo lipídico tem sido indicado por vários estudos como o principal alvo de atuação do Ácido Linoléico Conjugado (CLA), nomenclatura utilizada para representar um grupo de isômeros do Ácido Linoleico sintetizados naturalmente no rumen de animais. Os estudos realizados utilizando a suplementação com o CLA têm demonstrado resultados favoráveis em animais e humanos, principalmente em relação ao metabolismo lipídico. Esta classe de ácidos graxos parece ter influência no aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado e no músculo, através da maior expressão de enzimas oxidativas (PARIZA, 2000). Além disso, estudos apontam outros efeitos satisfatórios no metabolismo lipídico, como: diminuição dos lipídios plasmáticos em animais e humanos (SAKONO et al., 1999); aumento da lipólise (PARIZA et al., 2001); diminuição da leptina circulante (YAMASAKI et al., 2003) e diminuição da fome e da ingestão calórica (KAMPHUIS et al., 2002), entretanto, a forma de ação do CLA ainda não está totalmente elucidada. Os estudos que relacionam a suplementação com CLA e caquexia visaram investigar os efeitos na diminuição da perda de massa magra e parâmetros inflamatórios. Atualmente, não foram verificados estudos com a suplementação de CLA no metabolismo lipídico do fígado e tecido adiposo em animais com caquexia.

Nesse estudo, demonstraram-se pela primeira vez os efeitos da suplementação de CLA sobre parâmetros do metabolismo lipídico no fígado e tecido adiposo em ratos caquéticos. Contudo, este trabalho demonstrou que a suplementação com CLA falhou na tentativa de reparar os aspectos alterados no metabolismo lipídico afetados pela caquexia associada ao câncer. O presente estudo confirmou as principais alterações no metabolismo lipídico no fígado induzidos pela caquexia como previamente descrito pelo nosso grupo, como a esteatose (SEELAENDER et al, 1998) a diminuição da atividade da CPT II no fígado (KAZANTIS et al., 2005), redução da diminuição da expressão gênica da apoB e MTP no fígado (LIRA et al., 2008) e aumento de lipídios plasmáticos (TAG e colesterol total) (SEELAENDER et al., 1998). Os mecanismos responsáveis pelo comprometimento do metabolismo no fígado ainda não são totalmente compreendidos, entretanto a maioria das modificações está parcialmente relacionada com a produção de citocinas e eicosanóides pelo organismo, levando ao estabelecimento do estado crônico inflamatório (LIRA et al., 2008). A esteatose hepática compromete a função dos hepatócitos e foi sugerido por Seelaender et al. (1998) que este comprometimento contribui para o agravamento da caquexia.

O grupo controle com tumor (TB) apresentou aumento do conteúdo de gordura no fígado em relação a C, como previamente descrito pelo nosso grupo (SEELAENDER et al., 1998; LIRA et al., 2008). Entretanto esse aumento não foi revertido pela suplementação com CLA nos animais com tumor (TBCLA), que ao contrário, exacerbou o conteúdo de gordura em relação a TB. Este aumento de gordura está associado com o tipo de ácido graxo (CLA) e não à alta ingestão de gordura, visto que os grupos suplementados com óleo de girassol (SF) não apresentaram resultados similares. Muitos estudos têm demonstrado efeitos contraditórios da suplementação com CLA sobre a esteatose hepática. Os possíveis mecanismos envolvidos com o agravamento da esteatose promovido pela suplementação de CLA são: hiperglicemia (LI FEN LIU et al., 2001), levando a um aumento da lipogênese (JAVADI et al., 2004); aumento da delipidação lipídica do tecido adiposo, aumentando a captação de ácidos graxos pelo fígado (LA ROSA et al., 2006); diminuição da oxidação lipídica no fígado (REUVEN et al., 2006). Por outro lado, há poucos estudos demonstrando que a suplementação com CLA diminui a esteatose. Entretanto esses estudos diferem dos outros pois os animais utilizados na

pesquisa eram geralmente obesos e a esteatose era induzida por uma dieta hiperlipídica (PURUSHOTAM et al., 2007; NOTO et al., 2006). A suplementação com CLA não causou esteatose hepática nos animais controle (CCLA) em relação ao controle não suplementado (C), mas sugere-se que este fato esteja relacionado ao período de suplementação insuficiente para permitir a instauração desse sintoma, como anteriormente descrito (WANG et al., 2005).

Os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esteatose no modelo utilizado para indução de caquexia através do tumor de Walker 256 seriam: capacidade diminuída para oxidar gordura; capacidade diminuída do fígado de exportar lipídios através da VLDL; aumento da captação de ácidos graxos pelo fígado; aumento da lipogênese e esterificação de TAG no fígado. Como descrito anteriormente, a presença da caquexia afeta todas as etapas relacionadas à compartimentalização de lipídios no fígado. Desta forma, investigaram-se aspectos chave da partição lipídica neste órgão para poder identificar qual desses aspectos estaria envolvido no aumento da esteatose hepática nos grupos TB suplementados com CLA. Foram pesquisados aspectos chave da oxidação lipídica (atividade máxima da CPT I e II, expressão gênica da CPT I, II e do PPAR- α); exportação de lipídios do fígado para os tecidos através da montagem da VLDL (expressão gênica da apoB, MTP e expressão protéica da apoB) e estoque de lipídios no fígado (quantidade de triacilglicerol no fígado, expressão gênica da L – FABP).

O primeiro passo foi verificar a capacidade do fígado em oxidar gordura. O complexo enzimático carnitina palmitoil transferase (CPT) consiste na CPT I, CPT II e CACT (carnitina acil carnitina transferase). Este complexo é determinante na oxidação de ácidos graxos no fígado (BONEFONT et al., 2004). Desta forma, verificou-se a capacidade máxima da atividade enzimática das enzimas CPT I e CPT II, assim como a expressão gênica destas enzimas. Não houve mudanças entre os grupos C e TB em relação à expressão gênica da CPT I e CPT II, corroborando com estudo descrito previamente por KAZANTIS et al., (2005). Em relação à suplementação com CLA, os estudos ainda se mostram controversos, pois a maioria não demonstra alterações no mRNA da CPT I e CPT II com a suplementação desse ácido graxo (PURUSHOTAM et al., 2006; KÖNIG et al., 2007; MARTIM et al., 2000). Em contrapartida, outros estudos relatam aumento da expressão gênica dessas duas enzimas, mas esses trabalhos em

questão analisaram a expressão de proteínas do fígado de animais suplementados apenas com um tipo de isômero específico (Trans 10 Cis 12) não podendo ser, portanto comparado ao nosso protocolo experimental (GUDBRANDSEN et al., 2009; DEGRACE et al., 2004).

A atividade máxima da CPT II diminuiu cerca de 30% em todos os grupos quando comparados com o controle (C), como observado previamente por KAZANTIS et al., (2005), enquanto a atividade da CPT I manteve-se inalterada. O aumento da atividade e expressão da CPT I ocorre por regulação de fatores hormonais e dietéticos, e podem ser afetadas em resposta a diversos estímulos fisiológicos e patológicos, como o alto consumo de gordura e o jejum (LOUET, 2001). Entretanto, enquanto a CPT I é facilmente regulada por muitos fatores, CPT II é mais estável, demonstrando que sob condições patológicas ou pela suplementação lipídica crônica e sistemática, a CPT II pode diminuir sua atividade, restringindo a oxidação de ácidos graxos pela limitação do fluxo do citoplasma para o interior da matriz mitocondrial. Na caquexia, a diminuição da atividade da CPT II está associada a uma capacidade diminuída de oxidar ácidos graxos, sendo esse um dos fatores contribuintes para o aparecimento da esteatose (BONEFONT et al., 2004). Entretanto, este resultado não é suficiente para explicar o acúmulo de TAG no fígado dos ratos suplementados com CLA em relação a TB e TBSF, pois todos os grupos TB apresentaram a mesma redução da atividade máxima da CPT em relação ao controle. Muitos estudos mostraram aumento da atividade máxima da CPT I promovido pela suplementação com CLA em relação a C e SF (TAKAHASHI et al., 2003; DEGRACE et al., 2003; PRIORE et al., 2007), mas nenhum examinou a atividade máxima da CPT II. Portanto, este é o primeiro trabalho até então que mostra alterações na atividade máxima da CPT II após a suplementação com CLA. Os mecanismos através dos quais se dá tal regulação ainda permanecem desconhecidos. Sabe-se recentemente que alguns fatores são importantes na regulação do metabolismo lipídico, dentre eles pode-se destacar os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR). O PPAR- α , por exemplo, é um receptor nuclear abundante em células do fígado, cuja função é promover alterações celulares (aumento da expressão gênica de enzimas) responsáveis em aumentar a capacidade de oxidação lipídica hepática (SMITH, 2002). Para desempenhar sua função, o PPAR- α necessita de ligantes, como os ácidos graxos

(SAMPATH e NTAMBI, 2005), entretanto este receptor parece ter mais afinidade por Ácidos graxos poliinsaturados, como o CLA (BELURY et al., 2001).

O PPAR- α é um fator de transcrição responsável pelo aumento da expressão de mRNA de enzimas relacionadas à oxidação de ácidos graxos no fígado, como a CPT I e CPT II (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Muitos estudos demonstraram um aumento da expressão gênica desse fator nuclear promovido pela ingestão crônica de CLA (MOYA CAMARENA e BELURY, 1999; CHOI et al., 2007). Apesar disso, não observou-se efeitos da suplementação de ácidos graxos (CLA e óleo de girassol) em relação à expressão gênica de PPAR- α no fígado, corroborando com estudos realizados por König et al (2007) e Wendel et al., (2008).

Outro fator que pode indicar um aumento de TAG no fígado é o aumento da expressão da proteína ligadora de ácidos graxos (L-FABP). Esta proteína se liga aos ácidos graxos presente no citosol das células e é responsável pelo metabolismo, transporte e utilização dos ácidos graxos pelas células (KAZANTIS et al., 2005). A expressão gênica de L-FABP no fígado diminuiu em todos os grupos quando comparado ao controle. Trabalhos previamente publicados (KAZANTIS et al., 2005) não mostraram diferenças na expressão gênica da L-FABP no fígado de ratos portadores de tumor quando comparados com o controle. Entretanto verificou-se uma queda da expressão dessa proteína na zona periportal do fígado, responsável pela maior oxidação lipídica, enquanto observou-se aumento na área perivenosa, relacionada à montagem da VLDL. Nesse estudo, foi avaliado o tecido inteiro, sem distinções da zona de distribuição dos hepatócitos. Apesar disso, não descarta-se a possibilidade de uma alteração da expressão em algumas zonas, levando consequentemente a uma alteração funcional.

Outro mecanismo que regula o conteúdo de gordura no fígado e seu mau funcionamento pode estar relacionado ao aparecimento da esteatose é a produção da VLDL. Duas proteínas são essenciais para a montagem da VLDL: apoB é a principal apolipoproteína presente na partícula de VLDL e a MTP é a proteína responsável pela transferência do TAG para a VLDL nascente (KENDRICK et al., 1998). Na caquexia induzida pelo tumor de Walker, a produção e a secreção de VLDL estão reduzidas como

previamente relatado por Lira et al. (2008). Com o intuito de confirmar esses dados, investigou-se a expressão gênica da apoB e MTP, além da expressão protéica da apoB no modelo utilizado com a suplementação do CLA.

Os resultados apontaram para uma diminuição da expressão gênica da MTP em todos os grupos suplementados com gordura em relação ao grupo controle, com ou sem tumor, mostrando que a suplementação de gordura altera a regulação da apoB, mesmo em animais saudáveis. Perona et al. (2008) mostraram diminuição da expressão gênica da MTP em hepatócitos de ratos estimulados com óleo de girassol, quando comparados com aqueles estimulados com óleo de oliva virgem e grupos controle (sem estímulo de gordura). Uma possível explicação para esta diminuição está relacionado com uma regulação diminuída do PPAR- α , que também apresentou-se diminuído nesses hepatócitos. Entretanto, não foram encontradas alterações na expressão gênica do PPAR- α , provavelmente pela diferença de protocolos experimentais e forma de tratamento, sugerindo um mecanismo responsável pela redução da expressão de mRNA da apoB e MTP, independente do PPAR- α . Nenhum estudo até agora realizou experimentos relacionados à suplementação de CLA em relação à expressão gênica da MTP, mas acredita-se que os mecanismos de regulação são similares aos encontrados na suplementação com óleo de girassol. Como esperado, todos os grupos portadores de tumor apresentaram diminuição da expressão gênica da MTP, mas interessante, o grupo tumor suplementado com CLA apresentou uma redução ainda maior em relação aos outros grupos. Os fatores responsáveis pela indução da redução do mRNA da MTP e apoB no fígado de ratos caquéticos ainda não estão totalmente compreendidos, mas especula-se um dos motivos mais importantes está relacionado a fatores inflamatórios secretados pelas células dos tecidos hospedeiros, assim como poderia haver uma participação conjunta do tumor na liberação de citocinas e prostanóides. A suplementação com CLA poderia contribuir com este perfil inflamatório, induzindo uma secreção ainda maior de citocinas, levando ao agravamento do quadro de comprometimento do metabolismo lipídico.

Em relação à expressão gênica da apoB, TB apresentou diminuição quando comparado ao C, como demonstrado previamente pelo nosso grupo (LIRA et al., 2008).

Entretanto TBSF não apresentou diferença estatística em relação ao seu controle (CSF), que por sua vez não apresentou diferenças significativas em relação a C. Este resultado contraria um estudo prévio que associa a suplementação de óleo de girassol com uma diminuição da expressão do mRNA da apoB (PERONA et al., 2007). Este resultado não foi observado, tanto nos animais controle, quanto nos portadores de tumor, provavelmente pelo curto período de suplementação.

TBCLA apresentou diminuição da expressão de apoB em relação a TB, confirmando a capacidade do CLA de reduzir a expressão de mRNA da apoB, efeito geralmente associado ao isômero T-10 C-12 (MC LOAD et al., 2004). Em contrapartida, esse efeito não foi observado no grupo controle suplementado com CLA (CCLA), provavelmente pelo curto período de suplementação, pois na maioria dos trabalhos, verificou-se essa alteração em uma suplementação crônica de aproximadamente 4 semanas (MC LOAD et al., 2004). Nos grupos portadores de tumor, houve uma diminuição da expressão gênica dessa proteína, como esperado. Esta alteração se torna mais evidente com a suplementação de CLA. Estes resultados em conjunto demonstram a baixa capacidade do fígado de produzir VLDL, contribuindo para aumento do conteúdo de TAG no fígado dos ratos TB e essa condição se torna exacerbada nos ratos com tumor suplementados com CLA, agravando a esteatose na vigência da caquexia.

A expressão protéica da apoB foi realizada por Western Blotting, uma técnica aonde se utiliza um anticorpo específico que se liga à proteína em questão. Verificou-se uma diminuição da proteína no TB em relação a C. Este é o primeiro estudo que comprova a diminuição não só da expressão gênica, mas também redução do conteúdo protéico da apoB na vigência da caquexia, confirmando a hipótese de que na presença desta síndrome, ocorre uma redução da expressão gênica, levando à redução da proteína. O grupo TBCLA não reverteu este parâmetro alterado na caquexia, entretanto não apresentou uma diminuição em relação ao TB, como demonstrado na expressão gênica. Portanto, a suplementação com CLA modulou a expressão gênica da apoB, sem afetar o conteúdo protéico, que supostamente poderia ser afetado com uma suplementação crônica por um período maior, visto que apesar de não haver diferenças estatísticas entre os grupos TB e TBCLA, houve uma tendência do grupo TBCLA em reduzir a expressão

protéica da apoB. O grupo CCLA apresentou diminuição da apoB em relação ao C, corroborando com os estudos encontrados na literatura (PAL et al., 2005). Essa diminuição estaria supostamente relacionada ao efeito epigênico do CLA sobre esta proteína, levando à diminuição da sua expressão gênica e posterior diminuição da síntese proteica (PAL et al., 2005), como confirmado pelos nossos resultados. Além disso, a expressão protéica da apoB não é o único fator relevante na montagem e secreção da VLDL. Sabe-se que a regulação da montagem desta lipoproteína não depende apenas da produção da apoB, mas também de sua degradação (GIBBONS et al., 2004). As proteínas apoB recém sintetizadas atravessam o retículo endoplasmático ou podem se manter ligadas à membrana levando à sua degradação. Além disso, as proteínas formadas devem ser competentes para a secreção, caso contrário também são degradadas (KENDRICK et al., 1998). Portanto, a diminuição da secreção de VLDL pode ocorrer pela diminuição da produção de apoB, aumento da sua degradação ou por ambos os fatores.

Apesar da suposta diminuição da produção da VLDL no fígado, os resultados demonstraram que a suplementação com CLA e óleo de girassol em ratos portadores de tumor aumentou o TAG plasmático, cujo transporte está geralmente associado à VLDL. No TBSF, o aumento de TAG plasmático era esperado, corroborando com trabalhos prévios que mostram aumento de lipídios plasmáticos com a ingestão crônica de dieta hiperlipídica associado ao estado caquético. Entretanto, esperava-se ação oposta da suplementação de CLA, pois muitos estudos (NICOLSI et al., 1997; PARK et al., 1997) mostraram efeitos hipolipidêmicos da suplementação com CLA. Apesar destes trabalhos, outros autores relataram propriedades aterogênicas após esta suplementação (KRITCHEVSKY et al., 2000, VALLEILLE et al., 2005). Enquanto os estudos iniciais mostraram propriedades benéficas do CLA em relação ao perfil lipídico (DEGRACE et al., 2003), estudos recentes apontam um comprometimento do perfil lipídico em animais (ARBONES et al., 2006) e em humanos (TRICON et al., 2004). Após a suplementação, muitos fatores podem estar associados a controvérsias como: proporção de cada isômero na suplementação, espécie e idade do animal, tempo de suplementação, quantidade de gordura na dieta, perfil lipídico prévio, entre outros. O colesterol plasmático aumentou nos ratos sem tumor suplementados com CLA em relação ao controle, assim como os ratos com tumor suplementados com CLA em relação ao TB, mostrando um efeito

aterogênico dessa suplementação. Os trabalhos ainda são controversos em relação aos efeitos da suplementação de CLA no colesterol plasmático, devido aos mesmos fatores relacionados ao TAG plasmático. No grupo TBSF, verificou-se um aumento no colesterol plasmático em relação a CSF, entretanto este aumento não foi diferente em relação ao TB, mostrando o efeito deletério da caquexia no perfil lipídico (SEELAENDER et al., 1998). Esse aumento de colesterol induzido pela suplementação crônica de CLA foi relatado previamente (BISSONAUTH et al., 2006), mas os mecanismos ainda não estão elucidados.

No estado caquético, a concentração alta de VLDL no plasma não está relacionada com o aumento da secreção de VLDL no fígado, mas principalmente à incapacidade dos tecidos periféricos em captar ácidos graxos. Sabidamente, a atividade e expressão gênica da LPL, enzima responsável pela hidrólise do triacilglicerol contido na VLDL, está diminuída na caquexia, dificultando a captação de ácidos graxos pelo músculo e tecidos adiposos (SEELAENDER et al., 1998; COSTELLI et al., 1999). Provavelmente no grupo TBCLA, a LPL não está apenas comprometida no músculo esquelético (BELMONTE et al., 2004), mas também no tecido adiposo, afetando a lipogênese e promovendo a perda de peso (CASTELLANOS et al., 2009; XU et al., 2002). Muitos estudos relatam que uma possível inflamação no tecido adiposo seria capaz de induzir uma diminuição da expressão gênica da LPL. Nossos resultados indicam inflamação no tecido adiposo epididimal, que supostamente seria responsável pela diminuição da captação de ácidos graxos e diminuição dos estoques de triacilglicerol deste tecido.

Um possível quadro inflamatório do tecido adiposo promovido pela suplementação com CLA parece ser uma das causas da hiperglicemia. O grupo câncer suplementado com CLA (TBCLA) apresentou aumento significativo da insulina em relação ao grupo câncer controle (TB), indicando uma possível alteração na captação de glicose. A resistência à insulina têm sido relatada em vários estudos que utilizaram a suplementação com CLA (KENNEDY et al., 2010; CHURRUCA et al., 2009),

Nesse estudo não foi observado hiperinsulinemia promovida pela suplementação de CLA, como previamente relatada por outros autores (CHURRUCA et al., 2009; KENNEDY et al., 2008). Não se observou diferenças significativas na concentração de insulina no TBCLA em relação a TB e em CCLA em relação a C. A concentração de insulina em TB foi significativamente menor em relação a C, como previamente descrito pelo nosso grupo (SEELAENDER et al., 1994). A resposta insulínica à presença de glicose no sangue está alterada em ratos portadores de caquexia por disfunções metabólicas nas ilhotas β do pâncreas. Foram encontradas alterações na geração do inositol trifosfato e taxa de liberação de cálcio, comprometendo a secreção da insulina. A suplementação com CLA foi incapaz de reverter este quadro, diferentemente do óleo de girassol que promoveu aumento da secreção de insulina em TBSF. Estudos prévios mostram que ácidos graxos poliinsaturados da família ω -6 não promovem resistência à insulina (BERRY, 2001), mas uma ingestão elevada de ω -6 em relação à ingestão de ω -3 é capaz de promover resistência à insulina em animais e humanos (STOLL, 1997).

Apesar da diminuição da concentração de insulina nos grupos TB e TBCLA, observou-se um aumento do índice G/I em ambos os grupos quando comparados aos demais. Este índice mostra a quantidade de glicose plasmática referente a cada nanograma de insulina secretada. O TB apresentou aumento do índice G/I, comprovando a baixa secreção de insulina está afetando a captação de glicose. O TBCLA apresentou índice G/I aumentado em relação ao TB, apesar de não observar diferenças em relação à secreção de insulina entre os grupos. Postula-se que esse aumento pode ser ocasionado não apenas pela diminuição da secreção de insulina ocasionada pela presença da caquexia, mas também pode estar ocorrendo uma diminuição da sensibilidade à insulina no grupo suplementado com CLA. Como já discutido anteriormente, a inflamação do tecido adiposo epididimal observada, pode estar relacionada com uma diminuição da expressão gênica do GLUT 4, transportador de glicose do tecido adiposo e um dos principais causadores da resistência à insulina promovidas pelo CLA (KENNEDY et al., 2010; CHURRUCA et al., 2009). Portanto, o tecido adiposo parece estar relacionado à manifestação desses sintomas observados com a suplementação de CLA.

Além de comprovar as alterações já relatadas no metabolismo lipídico no fígado, este estudo revelou o perfil inflamatório em diferentes depósitos do tecido adiposo de ratos com caquexia induzida pelo câncer e os efeitos potencializadores da inflamação associados à suplementação com CLA. Estudos prévios realizados por nosso grupo relataram importantes alterações do metabolismo lipídico no tecido adiposo de animais caquéticos, como mudanças na composição de ácidos graxos, morfológicas e funcionais dos adipócitos, diminuição da concentração de leptina, infiltração de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias (MACHADO et al., 2004 e BERTEVELO e SEELAENDER, 2001). Portanto o tecido adiposo desempenha importante função no metabolismo lipídico e assim como no fígado, seu funcionamento está comprometido, piorando o estado caquético do indivíduo.

A grande maioria dos estudos relata perda de peso de animais por meio da suplementação com CLA, comprovando os resultados encontrados nesse trabalho. Apesar da redução significativa de peso dos ratos suplementados com CLA em relação aos grupos controle e SF, tanto em ratos com e sem tumor, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao peso relativo dos tecidos adiposos. Contudo, observou-se diferenças significativas em relação ao índice de adiposidade, o conteúdo de gordura e de proteína. O índice de adiposidade (IA) é a soma dos três principais tecidos adiposos brancos e verificou-se uma diminuição do peso desses tecidos em TB em relação a C. o grupo CCLA mostrou diminuição do IA em relação a C, comprovando o efeito do CLA na diminuição do tecido adiposo (PARIZA et al., 2000), mas não foram observadas diferenças estatísticas em TBCLA em relação a TB. Entretanto o grupo TBCLA apresentou redução significativa do estoque de gordura no TAE e TARP em relação aos outros grupos. Em contrapartida, houve um aumento do conteúdo de proteína nesses tecidos adiposos no TBCLA em relação aos outros grupos. A diminuição de gordura nesse tecido pode indicar um aumento da delipidação lipídica ou uma diminuição da captação e estoque de triacilglicerol. A diminuição da captação do triacilglicerol pelo tecido adiposo poderia estar relacionado ao aumento do triacilglicerol plasmático, como anteriormente discutido. Especula-se que o aumento de proteína seja causado por uma maior quantidade de tipos celulares diferentes dos adipócitos, como macrófagos infiltrantes, observados anteriormente (LA ROSA et al., 2006). A diferença entre o

conteúdo protéico e lipídico leva a uma alteração do perfil do TAE sem alterar o peso relativo quando comparado aos outros grupos. A diminuição do conteúdo de TAG no tecido adiposo, associado à infiltração de macrófagos resulta em alterações morfológicas, mas também em mudanças na secreção de adipocinas (fatores proteicos secretados pelo tecido adiposo), como a leptina.

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e fornece informações sobre a posição da reserva energética do organismo, atua no hipotálamo, regulando a sensação de fome, a utilização de substrato e o balanço energético (MACHADO et al., 2004). Neste estudo, a concentração de leptina está diminuída no TB em relação a C, como previamente descrito por nosso grupo (MACHADO et al., 2004). O tamanho do adipócito parece ser o principal fator influenciador da expressão gênica da leptina (ZHANG, 2002) e a secreção de leptina está diretamente associada à massa do tecido adiposo (TRAYHURN e BEATTIE, 2001). Como previamente demonstrado pelo nosso grupo (BERTEVELLO e SEELAENDER, 2001), a caquexia afeta o tamanho, forma e composição de ácidos graxos dos tecidos adiposos, levando a uma diminuição da concentração de leptina neste modelo experimental. A suplementação com CLA, assim como com óleo de girassol não foi capaz de reverter a este quadro nos animais caquéticos. Entretanto, observou-se uma diminuição da secreção de leptina em CCLA, em relação a C e CSF. Esta diminuição está provavelmente associada à diminuição da massa do tecido adiposo, corroborando com os resultados obtidos no índice de adiposidade. Portanto, ao analisar a relação leptina/IA, observa-se que a secreção de leptina foi proporcional à massa do tecido adiposo existente em todos os grupos comparados ao controle, com exceção do grupo TBCLA. Este grupo apresentou aumento significativo desta relação quando comparado aos demais grupos, supostamente indicando que a suplementação de CLA nos animais caquéticos leva a uma secreção relativamente maior de leptina em comparação ao TB. A maioria dos estudos mostra uma diminuição da secreção de leptina promovida pela suplementação com CLA (WENDEL et al., 2008; LIU et al., 2007; WANG et al., 2005; PURUSHOTAM et al., 2007), entretanto essa diminuição está relacionada à menor massa adiposa. Nenhum trabalho até o presente momento que se tenha conhecimento calculou a relação leptina/IA. Portanto, especula-se que a ação da suplementação do CLA pode ser diferente em relação aos

depósitos, possuindo um maior efeito delipidante sobre depósitos que não sejam tão metabolicamente ativos em relação à secreção deste hormônio.

A perda de peso promovida pela suplementação de CLA não está relacionada com a diminuição da ingestão calórica, como já mostrado anteriormente (MEDINA et al., 2000; KLOSS et al., 2005) e também apontado nesse estudo. Não houve diferenças entre os grupos em relação à ingestão alimentar e ingestão calórica total. Apenas observou-se diferença significativa em relação à ingestão de gordura nos grupos suplementados em relação aos controles com ou sem tumor, mas essa diferença não foi suficiente para promover um aumento da ingestão calórica total. A perda de peso associada à ingestão de CLA foi recentemente associada ao isômero T-10 C-12 e ocorre devido a um aumento da produção de citocinas pelo tecido adiposo (POIRIER et al., 2006). Os resultados obtidos comprovam que a suplementação com CLA aumentou o perfil inflamatório no tecido adiposo epididimal, com o aumento das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Para confirmar esses resultados, a IL-10 também foi dosada e a razão IL-10/TNF- α foi calculada. Atualmente essa razão tem sido postulada como um importante marcador do grau da inflamação, que está diretamente associada à morbidade e mortalidade de doenças associadas (LIRA et al., 2009). Nosso estudo mostra que apesar do aumento da citocina anti inflamatória IL-10 no TAE promovida pela suplementação de CLA no grupo câncer, a razão IL-10/TNF- α ainda encontra-se diminuída tanto no grupo TBCLA em relação a TB, como também no grupo CCLA em relação a C. Esses resultados associados aos resultados do aumento das citocinas IL-6 e IL-1 β no TAE promovidos pelo CLA nos grupos câncer comprovam a inflamação neste depósito do tecido adiposo. A razão IL-10/TNF- α também mostrou-se significativamente diminuída no TARP nos grupos TB e TBCLA em relação a seus respectivos controles (C e CCLA), apesar de não haver diferenças significativas em relação às citocinas inflamatórias. Este resultado mostra que possivelmente a suplementação com CLA tenha um estímulo menor no TARP.

Outros estudos descreveram o efeito da suplementação de CLA na inflamação do tecido adiposo e relacionam esse efeito ao isômero T-10 C-12 (HOUSE et al., 2005; PROIRIER et al., 2006). Este isômero pode ativar proteínas de membrana presentes nas células vasculares do estroma do tecido adiposo ou pode também entrar no citoplasma

por difusão, sendo convertido em metabólitos (HOUSE et al., 2005). Ambas as formas de ação são responsáveis pela ativação do NFκB, levando à produção de citocinas (TNF-α, IL1-β, IL-6), como descrito por Proirier et al. (2006). Nesse estudo, a suplementação de CLA nos ratos portadores de tumor levou a um aumento da produção de citocinas pró inflamatórias no tecido adiposo em comparação ao TB e a C, apenas no tecido adiposo epididimal. Tal efeito não foi observado no tecido adiposo retroperitoneal, mostrando a heterogeneidade do tecido adiposo (WOZNIAK et al., 2009), e uma maior estimulação do CLA no tecido adiposo epididimal, como previamente observado por Chung et al. (2005). Expecula-se que essas citocinas ativam os receptores de superfície de membrana no tecido adiposo, levando à supressão da atividade do PPAR-γ e expressão de genes adipogênicos, como a lipase de lipoproteína (LPL) do tecido adiposo, a sintase de ácidos graxos (FAS), e o GLUT 4 (CHUNG et al., 2005).

A diminuição da captação de glicose e ácidos graxos pelo tecido adiposo é responsável pela diminuição da síntese de TAG, levando a delipidação do tecido adiposo (HOUSE et al., 2005). A capacidade suprimida do adipócito de captar glicose e ácidos graxos pode contribuir para a hiperglicemia observada e alta concentração de TAG plasmático no grupo TBCLA, quando comparado com os demais grupos. A secreção de adipocinas e a hiperglicemia são positivamente correlacionadas com a resistência à insulina, sintoma que tem sido relatado em muitos estudos após suplementação de CLA (LIU et al., 2007; RISERIUS et al., 2004).

Portanto, o agravamento do estado caquético promovido pela suplementação com CLA parece se iniciar com a instauração do processo inflamatório no tecido adiposo epididimal. Esta inflamação seria supostamente responsável pela delipidação lipídica do tecido adiposo, além de ocasionar diminuição da captação de glicose e triacilgliceróis por esse depósito. Este fator explicaria o aumento da glicemia e do TAG plasmático. Além disso, a suplementação com CLA poderia estar relacionada a uma diminuição da produção de MTP e apoB, associada a uma diminuição da oxidação lipídica em animais com tumor, agravando ainda mais a esteatose hepática nos ratos portadores de tumor.

6 Conclusão

A caquexia é uma síndrome paraneoplásica que leva a um comprometimento do metabolismo energético, como alterações do metabolismo lipídico no fígado. Apesar dos trabalhos publicados que relatam ação benéfica da suplementação com ácido linoléico conjugado em relação à oxidação lipídica no fígado e diminuição de lipídios plasmáticos, o CLA falhou em reverter esses parâmetros alterados, além de piorar o quadro de hiperlipidemia e esteatose hepática em ratos portadores de tumor. Essas alterações estão associados ao tipo de ácido graxo específico (CLA) e não estão associados à suplementação com ácidos graxos poliinsaturados ω -6.

Os animais suplementados com CLA diminuíram o peso total e a massa gorda em relação aos controles e tal efeito pode ser supostamente explicado através da inflamação do tecido adiposo epididimal, representado pelo aumento de citocinas pró inflamatórias produzidas por este tecido.

A esteatose hepática exacerbada pelo efeito da suplementação com CLA pode estar relacionada com a diminuição da expressão gênica da MTP, assim como diminuição da expressão gênica e da proteína apoB.

A hiperglicemia encontrada nos ratos suplementados pode indicar um início do quadro de resistência à insulina, que pode ocorrer no tecido adiposo epididimal em decorrência do quadro inflamatório.

Expecula-se que a hipertriacilgliceridemia nos grupos CLA estaria relacionada à uma diminuição da captação de ácidos graxos pelo tecido adiposo epididimal, em decorrência do quadro inflamatório associado a uma diminuição da insulina circulante.

Os mecanismos relacionados aos efeitos da suplementação com CLA ainda não estão totalmente elucidados, entretanto este estudo sugere que eles podem estar relacionados com o aumento do perfil inflamatório no tecido adiposo epididimal. Este estudo demonstra pela primeira vez que a suplementação com CLA não é uma alternativa indicada como terapia nutricional na melhora dos sintomas presentes na caquexia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

ALEXANDER, C. A.; HAMILTON, R. L.; HAVEL, R. J. Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. **J. Cell. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 241-263, 1976.

ANDREOLI, M. F.; GONZALEZ, M. A.; MARTINELLI, M. I.; MOCCHIUTTI, N. O.; BERNAL, C. A. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. **J. Nutr.**, V. 25, n. 4, p. 445 – 452, 2009.

ARBONÉS-MAINAR, J. M.; NAVARRO, M. A.; ACÍN, S.; GUZMÁN, M. A.; ARNAL, C.; SURRA, J. C.; CARNICER, R.; ROCHE, H. M.; OSADA, J. Trans-10, cis-12- and cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid isomers selectively modify HDL-apolipoprotein composition in apolipoprotein E knockout mice. **J. Nutr.**, v. 136, n. 2, p. 353 -359, 2006.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; BUSQUETS, S. Novel approaches to the treatment of cachexia. **Drug. Discov. Today.**, v. 13, n. 1, p. 73 – 78, 2008.

ASP, L.; CLAEISSON, C.; BOREN, J.; OLOFSSON, S. O. ADP-ribosylation factor 1 and its activation of phospholipase D are important for the assembly of very low density lipoproteins. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 34, p. 26285-26292, 2000.

BADDINI F. A.; FERNANDES P. A.; FERREIRA DA COSTA N.; GONÇALVES R. B. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. **Nutr. Hosp.**, v. 24, n. 4, p. 422 – 428, 2009.

BANNI, S. Conjugated Linoleic Acid metabolism. **Current Opin. Lipid.**, v. 13, p. 261-266, 2002.

BARBER, M. D.; ROSS, J. A.; FEARON, K. C. Cancer cachexia. **Surg. Oncol.**, v. 8, n. 3, p. 133 – 141.

BERRY, E. M. Who's afraid of n-6 polyunsaturated fatty acids? Methodological considerations for assessing whether they are harmful. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 11, n. 3, p. 181 – 188, 2001.

BHATTACHARYA, A.; RAHMAN, M. M.; SUN, D.; LAWRENCE, R.; MEJIA, W.; MCCARTER, R.; O'SHEA, M.; FERNANDES, G. The combination of dietary conjugated linoleic acid and treadmill exercise lowers gain in body fat mass and enhances lean body mass in high fat-fed male Balb/C mice. **J. Nutr.**, v. 135, n. 5, p. 1124 – 1230, 2005.

BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A. Biosynthesis of CLA in ruminants. **Proc. Am. Soc. An. Sci.**, v. 1, p. 148 -152, 1999.

BING, C.; TRAYHURN, P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 11, n. 3, p. 201 – 207, 2008.

BISSONAUTH, V.; CHOUINARD, Y.; MARIN, J.; LEBLANC, N.; RICHARD, D.; JACQUES, H. The effects of t10,c12 CLA isomer compared with c9,t11 CLA isomer on lipid metabolism and body composition in hamsters. **J. Nutr. Biochem.**, v. 17, n. 9, p. 597 – 603, 2005.

BLACK, I. L.; ROCHE, H. M.; GIBNEY, M. J. Chronic but not Acute Treatment with Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers (trans-10, cis-12 CLA and cis-9, trans- 11 CLA) affects Lipid Metabolism in Caco-2 Cells. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2167 - 2173, 2002.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J.; FAGERTUN, H. Conjugated Linoleic Acid reduces Body Fat Mass in Overweight and Obese Humans. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2943-2948, 2000.

BONNEFONT, J. P.; DJOUADI, F.; PRIP-BUUS, C.; GOBIN, S.; MUNNICH, A.; BASTIN, J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. **Mol. Aspects Med.**, v. 25, n. 5, p. 495 – 520, 2004.

BOSAEUS, I. Nutritional support in multimodal therapy for cancer cachexia. **Supp. Care Cancer**, v. 16, n. 5, p. 447 – 451, 2008.

BOUTHEGOURD, J. C.; EVEN, P. C.; GRIPOIS, D.; TIFFON, B.; BLOUQUIT, M. F.; ROSEAU, S.; LUTTON, C.; TOME, D.; MARTIN, J. C. A CLA mixture prevents body triglyceride accumulation without affecting energy expenditure in Syrian hamsters. **J. Nutr.**, v. 132, n. 9, p. 2682 – 2689, 2002.

BREMER, J.; NORUM, K. R. Palmityl Co-A: Carnitine O-palmityltransferase in the mitochondrial oxidation of palmityl Co-A. **Eur. J. Biochem.**, v. 1, p. 427-433, 1967.

BROWN, J. M.; HALVORSEN, Y. D.; LEA-CURRIE, Y. R. *Trans-10, Cis-12, but not Cis-9, Trans-11, CLA attenuates Lipogenesis in Primary Cultures of Stromal Vascular Cells from Human Adipose Tissue.* **J. Nutr.**, v. 131, p. 2316-2321, 2001.

CASTELLANOS-TAPIA, L.; YEPIZ-PLASENCIA, G.; MOYA-CAMARENAA, S. Y. Dietary conjugated linoleic acid induces tissue-specific lipoprotein lipase mRNA modulation in high-sucrose-fed mice. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 54, n. 2, p. 131 -137, 2009.

CHOI, J. S.; KOH, I. U.; JUNG, M. H.; SONG, J. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. **Br. J. Nutr.**, v. 98, n. 2, p. 264 – 275, 2007.

CHUNG, S.; BROWN, J. M.; PROVO, J. N.; HOPKINS, R.; MCINTOSH, M. K. Conjugated linoleic acid promotes human adipocyte insulin resistance through NFkappaB-dependent cytokine production. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 46, p. 38445 – 38456, 2005.

CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; PORTILLO, M. P. Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 105 – 111, 2009.

CINTI, S. Anatomy of the adipose organ. **Eat. Weight Disord.**, v. 5, n. 3, p. 132 – 142, 2000.

COSTELLI, P.; TESSITORE, L.; BATETTA, B.; MULAS, M. F.; SPANO, O.; PANI, P.; BACCINO, F. M.; DESSÌ, S. Alterations of lipid and cholesterol metabolism in cachectic tumor-bearing rats are prevented by insulin. **J. Nutr.**, v. 129, n. 3, p. 700 -706, 1999.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E. A. Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. **Biochem. J.**, v. 250, p. 383-388, 1988.

DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAVIDSON, L. K.; KRAUSE, J. A.; SMITH, L. C.; DAUCHY, E. M. Physiologic melatonin concentration, omega-3 fatty acids, and conjugated linoleic acid inhibit fatty acid transport in rodent hind limb skeletal muscle in vivo. **Comp. Med.**, v. 53, n. 2, p. 186 – 190, 2003.

DEGRACE, P.; DEMIZIEUX, L.; GRETI, J.; CHARDIGNY, J. M.; SÉBÉDIO, J. L.; CLOUET, P. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10,cis-12-isomer of linoleic acid. **J Nutr.**, v. 134, n. 4, p. 861 – 867, 2004.

DEMAREE, S. R.; GILBERT, C. D.; MERMSMANN, H. J. Conjugated Linoleic Acid Differentially modifies Fatty Acid Composition in Subcellular fractions of muscle and Adipose Tissue but not adiposity of postweaning pigs. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3272-3279, 2002.

DEWYS, W. D.; BEGG, C.; LAVIN, P. T.; BAND, P. R.; BENNETT, J. M.; BERTINO, J. R.; COHEN, M. H.; DOUGLASS, H. O JR.; ENGSTROM, P. F.; EZDINLI, E. Z.; HORTON, J.; JOHNSON, G. J.; MOERTEL, C. G.; OKEN, M. M.; PERLIA, C.; ROSENBAUM, C.; SILVERSTEIN, M. N.; SKEEL, R. T.; SPONZO, R. W.; TORMEY, D. C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. **Am. J. Med.**, v. 69, n. 4, p. 491 – 497, 1980.

DUERDEN, J. M.; BARTLETT, S. M.; GIBBONS, G. F. Regulation of very-low-density-lipoprotein lipid secretion in hepatocyte cultures derived from diabetic animals. **Biochem. J.**, v. 262, n. 1, p. 313-319, 1989.

DURSTINE, J. L.; GRANDJEAN, P. W.; COX, C. A.; THOMPSON, P. D. Lipids, lipoproteins, and exercise. **J. Cardiopulm. Rehabil.**, v. 22, p. 385-398, 2002.

FEARON, K. C.; MOSES, A. G. Cancer cachexia. **Int. J. Cardiol.**, v. 85, n. 1, p. 73 – 81, 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G.; TANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, n. 1, p. 497 – 509, 1956.

GIBBONS, G. F. A comparison of in-vitro models to study hepatic lipid and lipoprotein metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 5, n. 3, p. 191 – 199, 1994.

GIBBONS, G. F. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. **Biochem. J.**, v. 15, n. 1, p. 1 – 13, 1990.

GIBBONS, G. F.; ISLAM, K.; PEASE, R. J. Mobilisation of triacylglycerol stores. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1483, n. 1, p. 37 -57, 2000.

GIBBONS, G. F.; WIGGINS, D.; BROWN, A. M.; HEBBACHI, A. M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 59-64, 2004.

GRAVES, E.; HITT, A.; PARIZA, M.W.; COOK, M. E.; MCCARTHY, D. O. Conjugated linoleic acid preserves gastrocnemius muscle mass in mice bearing the colon-26 adenocarcinoma. **Res Nurs Health.**, v. 28, 2005 Feb;28(1):48-55.

GUDBRANDSEN, O. A.; RODRÍGUEZ, E.; WERGEDAHL, H.; MØRK, S.; RESELAND, J. E.; SKORVE, J.; PALOU, A.; BERGE, R. K. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid reduces the hepatic triacylglycerol content and the leptin mRNA level in adipose tissue in obese Zucker fa/fa rats. **Br. J. Nutr.**, v. 102, n. 6, p. 803 -815, 2009.

HASSID, W. Z.; ABRAHAMAS, S. Chemical procedures for analyses of polisacharides. **Methods enzymol**, 3: 34-51, 1957.

HAVEL, R. J.; HAMILTON, R. L. Hepatic catabolism of remnant lipoproteins: where the action is. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 2, p. 213-215, 2004.

HOUSE, R. L.; CASSADY, E. J.; EISEN, M. K. Conjugated linoleic acid evokes delipidation through the regulation of genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. **Int. Assoc. Study Obes.**, v. 6, p. 247-258, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCHES IN CANCER. Handbooks of Cancer prevention. **Weight Control and Physical Activity**. V. 6, P. 237-356, 2002.

JAVADI, M.; BEYNEN, A. C.; HOVENIER, R.; LANKHORST, A.; LEMMENS, A. G.; TERPSTRA, A. H.; GEELLEN, M. J. Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation. **J. Nutr. Biochem.**, v. 15, n. 11, p. 680 – 687, 2004.

KAMPHUIS, M.; LEJEUNE, M.; SARIS, W. *Effect of Conjugated Linoleic Acid supplementation after weight loss on appetite and food intake in overweight subjects*. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 1268-1274, 2003.

KANG, K.; PARIZA, M. Trans-10, Cis- 12 CLA reduces Leptin secretion from 3T3-L1 Adipocytes. **Bioch. Biophys. Research Commun.**, v. 287, p. 377-382, 2001.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. C. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell. Tissue Res.**, v. 321, n. 3, p. 419 – 427, 2005.

KENDRICK, J. S.; WILKINSON, J.; HIGGINS, J. A. Mechanisms of inhibition of hepatic secretion of very low density lipoproteins by dietary fish oils. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 26, n. 2, p. 183 – 190, 1998.

KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUNG, S.; LAPOINT, K.; HOPKINS, R.; SCHMIDT, S. F.; ANDERSON, K.; MANDRUP, S.; MCINTOSH, M. Inflammation and insulin resistance induced by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid are dependent on intracellular calcium levels in primary cultures of human adipocytes. **J. Lipid Res.**, v. 14, p. 1 – 8, 2010.

KENNEDY, A.; OVERMAN, A.; LAPOINT, K.; HOPKINS, R.; WEST, T.; CHUANG, C. C.; MARTINEZ, K.; BELL, D.; MCINTOSH, M. Conjugated linoleic acid-mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes are attenuated by resveratrol. **J. Lipid Res.**, v. 50, n. 2, p. 225 – 232, 2009.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Fatty acid import into mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1486, n. 1, p. 1-17, 2000.

KÖNIG B, SPIELMANN J, HAASE K, BRANDSCH C, KLUGE H, STANGL G. I, EDER K. Effects of fish oil and conjugated linoleic acids on expression of target genes of PPAR alpha and sterol regulatory element-binding proteins in the liver of laying hens. **Br J Nutr.**, v. 100, n. 2, p. 355 – 363, 2008.

KLOSS, R.; LINSCHIED, J.; JOHNSON, A.; LAWSON, B.; EDWARDS, K.; LINDER, T.; STOCKER, K.; PETITTE, J.; KERN, M. Effects of conjugated linoleic acid supplementation on blood lipids and adiposity of rats fed diets rich in saturated versus unsaturated fat. **Pharmacol. Res.**, v. 51, n. 6, p. 503 – 507, 2005.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S. K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 472S – 477S, 2000.

LA ROSA, P. C.; MINER, J.; XIA, Y.; ZHOU, Y.; KACHMAN, S.; FROMM, M. E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis. **Physiol. Genomics.**, v. 27, n. 3, p. 282 – 294, 2006.

LARSEN, A. E.; CROWE, T. C. Effects of conjugated linoleic acid on myogenic and inflammatory responses in a human primary muscle and tumor coculture model. **Nutr. Cancer**, v. 61, n. 5, p. 687 – 695, 2009.

LI, G.; DONG, B.; BUTZ, D. E.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; COOK, M. E. NF-kappaB independent inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase by a conjugated

linoleic acid cognate, conjugated nonadecadienoic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n. 9, p. 969 – 972, 2006.

LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; ZANCHI, N. E.; YAMASHITA, A. S.; LOPES, R. D.; LOPES, A. C.; BATISTA, M. L. JR.; SEELAENDER, M. Regulation of inflammation in the adipose tissue in cancer cachexia: effect of exercise. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 27, n. 2, p. 71 – 75, 2009.

LIRA, F. S.; TAVARES, F. L.; YAMASHITA, A. S.; KOYAMA, C. H.; ALVES, M. J.; CAPERUTO, E. C.; BATISTA, M. L. JR.; SEELAENDER, M. Effect of endurance training upon lipid metabolism in the liver of cachectic tumour-bearing rats. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 26, n. 6, p. 701-708, 2008.

LIU, L. F.; PURUSHOTHAM, A.; WENDEL, A. A.; BELURY, M. A. Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v 292, n. 6, p. 1671 – 1682, 2007.

LOUET, J. F.; LE, M. C.; PÉGORIER, J. P.; DECAUX, J. F.; GIRARD, J. Regulation of liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by hormones and fatty acids. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 29, n. 2, p. 310 – 316, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265 – 275, 1951.

MACHADO, A. P.; COSTA ROSA, L. F.; SEELAENDER, M. C. Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. **Cell. Tissue Res.**, v. 318, n. 3, p. 503 – 514, 2004.

MARTIN, J.; VALEILLE, K. *Conjugated Linoleic Acids: All the same or to everyone its own function?* **Reprod. Nutr. develop.**, v. 42, p. 525-536, 2002.

MCCARTHY, D. O. Rethinking nutritional support for persons with cancer cachexia. **Biol. Res. Nurs.**, v. 5, n. 1, p. 3 – 17, 2003.

MCCARTHY, D. O.; GRAVES, E. Conjugated linoleic acid preserves muscle mass in mice bearing the Lewis lung carcinoma, but not the B16 melanoma. **Res. Nurs. Health.**, v. 29, n. 2, p. 98 – 104, 2006.

MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 395-420, 1980.

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. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 6, p. 1169 – 1174, 2004.

MCMILLAN, D. C. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 12, n. 3, p. 223 – 226, 2009.

MEDINA, E.; HORN, W.; KEIM, N. CLA supplementation in Humans: Effects on Circulating Leptin Concentrations and Appetite. **Lipids**, v. 35, n. 7, p. 783- 788, 2000.

MIZANOOR, S.; WANG, Y.; YOTSUMOTO, H. Effect of CLA on serum Leptin concentration, Body-fat accumulation, and β -Oxidation of Fatty Acid in OLETF rats. **Nutrition**, v. 17, p. 385-390, 2001.

MOON, H. S.; LEE, H. G.; SEO, J. H.; CHUNG, C. S.; GUO, D. D.; KIM, T. G.; CHOI, Y. J.; CHO, C. S. Leptin-induced matrix metalloproteinase-2 secretion is suppressed by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 18, n. 4, p. 955 – 960, 2007.

MOTTA, VT. Bioquímica clínica para o laboratório. 1^a ed. São Paulo: Educ, 2005.

MOYA-CAMARENA, S. Y.; VANDEN HEUVEL, J. P.; BLANCHARD, S. G.; LEESNITZER, L. A.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. **J. Lipid Res.**, v. 40, n. 8, p. 1426 – 1433, 1999.

MÜLLER, I.; MUNDER, M.; KROPF, P.; HÄNSCH, G. M. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? **Trends Immunol.** , v. 30, n. 11, p. 522 – 530, 2009.

MURTHY, M. S.; PANDE, S. V. Malonyl-CoA-sensitive and -insensitive carnitine palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 28, p. 18283-18286, 1994.

NGUYEN, P.; LERAY, V.; DIEZ, M.; SERISIER, S.; LE, BLOC'H J.; SILIART, B.; DUMON, H. Liver lipid metabolism. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v. 92, n. 3, p. 272 – 283, 2008.

NICOLOSI, R. J.; ROGERS, E. J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J. A.; HUTH, P. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, v. 22, n. 5, p. 266 – 277, 1997.
NOTO, A.; ZAHRADKA, P.; YURKOVA, N.; XIE, X.; NITSCHMANN, E.; OGBORN, M.; TAYLOR, C. G. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. **Lipids.** , v. 41, n. 2, p. 179 – 188, 2006.

OLPIN, S. E. Implications of impaired ketogenesis in fatty acid oxidation disorders. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 70, n. 3, p. 293 – 308, 2004.

PAL, S.; TAKECHI, R.; HO, S. S. Conjugated linoleic acid suppresses the secretion of atherogenic lipoproteins from human HepG2 liver cells. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 43, n. 3, p. 269 -274, 2005.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 223, p. 8 –13, 2000.

PERONA, J. S.; AVELLA, M.; BOTHAM, K. M.; RUIZ-GUTIERREZ, V. Differential modulation of hepatic very low-density lipoprotein secretion by triacylglycerol-rich lipoproteins derived from different oleic-acid rich dietary oils. **Br. J. Nutr.**, v. 99, n. 1, p. 29 -36, 2008.

PETRIDOU, A.; MOUGIOS, V.; SEGREDOS, A. Supplementation with CLA: Isomer Incorporation into serum lipids and effect on Body Fat of Woman. **Lipids**, v. 38, p. 805-811, 2003.

POIRIER, H.; SHAPIRO, J. S.; KIM, R. J.; LAZAR, M. A. Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1634 – 1641, 2006.

PRATA, P. R. The Epidemiologic Transition in Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 8, n. 2, p. 168 -175, 1992.

PRIORE, P.; GIUDETTI, AM.; NATALI, F.; GNONI, GV.; GEELEN, MJ. Metabolism and short-term metabolic effects of conjugated linoleic acids in rat hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1771, n. 10, p. 1299 -1307, 2007.

PURUSHOTHAM, A.; SHRODE, G. E.; WENDEL, A. A.; LIU, L. F.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18, n. 10, p. 676 – 684, 2007.

RAYALAM, S.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, n. 11, p. 717 – 726, 2008.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Caracterização do polímero do óleo de girassol obtido por aquecimento. **Revista Analítica**, outubro, 2006.

RISÉRIUS, U.; SMEDMAN, A.; BASU, S. CLA and Body Weight Regulation in Humans. **Lipids**, v. 38, n. 2, p. 133- 137, 2003.

RISÉRUS, U.; VESSBY, B.; ARNER, P.; ZETHELIUS, B. Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: close association with impaired insulin sensitivity. **Diabetologia**, v. 47, n. 6, p. 1016 – 1019, 2004.

RODRIGUEZ-ALCALA, L. M.; FONTECHA, J. Composition of Commercial CLA-Fortified Dairy Products: Evaluation After Processing and Storage. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 2083–2090, 2006.

RODRIGUEZ, E.; RIBOT, J.; PALOU, A. Trans-10, Cis- 12, but not Cis-9, Trans-11 CLA isomer, inhibits brown adipocyte thermogenic capacity. **Am. J. Phys. Regul. Integrative Comp. Physiol.**, v. 282, p. R1789-R1797, 2002.

SAINI, A.; AL-SHANTI, N.; STEWART, C. E. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 17, n. 6, p. 475 – 486, 2006.

SAKONO, M.; MIYANAGA, F.; KAWAHARA, S. Dietary CLA reciprocally modifies Ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. **Lipids**, v. 34, p. 997-1000, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** – an annual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annu Rev Nutr.**, v. 25, p. 317 – 340, 2005.

SEELAENDER, M. C.; NASCIMENTO, C. M.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Studies on the lipid metabolism of Walker 256 tumour-bearing rats during the development of cancer cachexia. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 39, n. 5, p. 1037 – 1047, 1996.

SEELAENDER, M. C. L.; CURI, R.; COLQUHOUN, A.; WILLIAMS, J. F.; ZAMMITT, V. A. Carnitine palmitoyltransferase II activity is decreased in liver mitochondria of cachectic rats bearing the walker 256 carcinosarcoma: effect of indomethacin treatment. **Bioch. Molec. Biology Int.**, v. 44, p. 185-193, 1998.

SERUGA, B.; ZHANG, H.; BERNSTEIN, L. J., TANNOCK, I. F. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, n. 11, p. 887 – 899, 2008.

SHEPHERD, J. Lipoprotein metabolism: an overview. **Ann. Acad. Med. Singapore.**, v. 21, n. 1, p. 106-113, 1992.

SHER, J.; PRONCZUK, A.; HAJRI, T. Dietary CLA lowers Plasma Cholesterol during Cholesterol supplementation, but accentuates the Atherogenic Lipid Profile during the Acute Phase response in hamsters. **J. Nutr.**, v. 133, p. 456-460, 2003.

SILVEIRA, M. B.; CARRARO, R.; MONEREO, S.; TÉBAR, J. Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. **Public. Health Nutr.**, v. 10, n. 10, p. 1181 – 1186, 2007.

SKIPWORTH, R.J.; STEWART, G.D.; DEJONG, C.H.; PRESTON, T.; FEARON, K.C. Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction? **Clin. Nutr.**, v. 26, n. 6, p. 667 – 676, 2007.

SPASSIANI, N. A.; KUK, J. L. Exercise and the fatty liver. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 33, n. 4, p. 802-807, 2008.

STACHOWSKA E, BAŚKIEWICZ-MASIUK M, DZIEDZIEJKO V, ADLER G, BOBER J, MACHALIŃSKI B, CHLUBEK D. Conjugated linoleic acids can change phagocytosis of human monocytes/macrophages by reduction in Cox-2 expression. **Lipids**, v. 42, n. 8, p. 707 – 716, 2007.

STEFANICK, M. L.; MACKEY, S.; SHEEHAN, M.; ELLSWORTH, N.; HASKELL, W. L.; WOOD, P. D. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. . **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 1, p. 12-20, 1998.

STOLL, B.A. Western nutrition and the insulin resistance syndrome: a link to breast cancer. **Eur J Clin Nutr.**, v. 53, n. 2, 1999.

TAKAHASHI, Y., KUSHIRO, M., SHINOHARA, K. Dietary CLA reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. **Comparative Biochem. Physiol. Part B**, v. 133, p. 395-404, 2002.

TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed Conjugated Linoleic Acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1631, p. 265-273, 2003.

TAN, B. H.; DEANS, D. A.; SKIPWORTH, R. J.; ROSS, J. A.; FEARON, K. C. Biomarkers for cancer cachexia: is there also a genetic component to cachexia? **Support. Care Cancer**, v. 16, n. 3, p. 229 – 234, 2008.

TAN, B. H.; FEARON, K. C. Cachexia: prevalence and impact in medicine. **Curr Opin Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 11, n. 4, p. 400 – 407, 2008.

TERPSTRA, A.; JAVADI, M.; BEYNEN, A. *Dietary Conjugated Linoleic Acids as free Fatty Acids and Triacylglycerols similarly affect Body Composition and Energy Balance in Mice.* **J. Nutr.**, v. 133, p. 3181-3186, 2003.

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. **J. Nutr.**, v. 138, n. 8, p. 1445 – 1451, 2008.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 1, p. 15 – 23, 2001.

TISDALE, M. J. Pathogenesis of cancer cachexia. **J. Support. Oncol.**, v. 1, n. 3, p. 159 – 168, 2003.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, n. 4, p. 299 – 305, 2004.

TISDALE M. J. Catabolic mediators of cancer cachexia. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.**, v. 2, n. 4, p. 256 – 261, 2008.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 2, p. 381 – 410, 2009.

TOPPING, D. L.; MAYES, P. A. Insulin and non-esterified fatty acids. Acute regulators of lipogenesis in perfused rat liver. **Biochem. J.**, v. 204, n. 2, p. 433-439, 1982.

TRICON, S.; BURDGE, G. C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, 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.**, v. 80, n. 3, p. 614 – 620, 2004.

UNGER, R. H.; ZHOU, Y. T.; ORCI, L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, n. 5, p. 2327-2332, 1999.

VALEILLE, K.; FÉRÉZOU, J.; AMSLER, G.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A.; PARQUET, M.; GRIPOIS, D.; DOROVSKA-TARAN, V.; MARTIN, J. C. A cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, n. 2, p. 652 – 659, 2005.

WANG, L. S.; HUANG, Y. W.; SUGIMOTO, Y.; LIU, S.; CHANG, H. L.; YE, W.; SHU, S.; LIN, Y. C. Effects of human breast stromal cells on conjugated linoleic acid (CLA) modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in MCF-7 cells. **Anticancer Res.**, v. 25, n. 6B, p. 4061 – 4068, 2005.

WASSERMAN, D. H.; SPALDING, J. A.; BRACY, D.; LACY, D. B.; CHERRINGTON, A. D. Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work. **Diabetes**, v. 38, n. 6, p. 799-807, 1989.

WENDEL, A. A.; PURUSHOTHAM, A.; LIU, L. F.; BELURY, M. A. Conjugated linoleic acid fails to worsen insulin resistance but induces hepatic steatosis in the presence of leptin in ob/ob mice. **J. Lipid Res.**, v. 49, n. 1, p. 98 – 106, 2008.

WIGMORE, S. J.; FEARON, K. C.; MAINGAY, J. P.; ROSS, J. A. Down-regulation of the acute-phase response in patients with pancreatic cancer cachexia receiving oral eicosapentaenoic acid is mediated via suppression of interleukin-6. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 92, n. 2, p. 215 -221, 1997.

WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E2. Distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 41, p. 25693 – 25699, 1997.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Regulated biosynthesis and divergent metabolism of three forms of hepatic apolipoprotein B in the rat. **J. Lipid Res.**, v. 26, n. 1, p. 70-81, 1985.

WITTERS, L. A.; WATTS, T. D.; DANIELS, D. L.; EVANS, J. L. Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 85, n. 15, p. 5473-5477, 1988.

WOELTJE, K. F.; KUWAJIMA, M.; FOSTER, D. W.; MCGARRY, J. D. Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. II. Use of detergents and antibodies. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 20, p. 9822-9827, 1987.

WOZNIAK, S. E.; GEE, L. L.; WACHTEL, M. S.; FREZZA, E. E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Dig. Dis. Sci.**, v. 54, n. 9, p. 1847 – 1856, 2009.

XU, X.; STORKSON, J.; KIM, S. Short-term intake of Conjugated Linoleic Acid inhibits Lipoprotein Lipase and glucose metabolism but does not Enhance Lipolysis in mouse adipose tissue. **J. Nutr.**, v. 133, p. 663-667, 2003.

YAMASAKI, M.; IKEDA, A.; OJI, M. Modulation of Body Fat and serum lipids levels by dietary CLA in sprague-Dawley rats fed various fat-levels diet. **Nutrition**, v. 19, p. 30-35, 2003.

YANAGITA T, NAGAO K. Functional lipids and the prevention of the metabolic syndrome. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 189 – 191, 2008.

YANG, M.; COOK, M. E. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, n. 1, p. 51 – 58, 2003.

ZAMMIT, V. A.; CORSTORPHINE, C. G. Altered release of carnitine palmitoyltransferase activity by digitonin from liver mitochondria of rats in different physiological states. **Biochem. J.**, v. 230, n. 389-394, 1985.

ZAMMIT, V. A. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. **Progr. Lipid Res.**, v. 38, p. 199-224, 1999.