

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM IMUNOLOGIA

**Victor Eustáquio Tostes Zidirich**

**EFEITOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) CIS-9 TRANS-  
11 NA RESPOSTA IMUNE À OVALBUMINA**

Juiz de Fora

2011

**VICTOR EUSTÁQUIO TOSTES ZIDIRICH**

**EFEITOS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) CIS-9 TRANS-11 NA RESPOSTA IMUNE À OVALBUMINA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área de concentração: Imunologia e DIP, da Universidade Federal de Juiz de Fora, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: de concentração: Imunologia e DIP.

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira**

Juiz de Fora

2011

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, pela graça que me foi concedida de concluir mais uma jornada, e por ser a fonte e inspiração de todo o conhecimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ferreira pela paciência extrema e pela ajuda ao longo dessa caminhada.

Agradeço aos meus co-orientadores Marco Antônio Sundfeld da Gama, Fernando César Ferraz e Marlice Teixeira Ribeiro (EMBRAPA-CNPGL), exemplos de empenho profissional. A cada dia provam que fazer ciência em nossa realidade é possível.

Às minhas tias Geni e Nêmera, à minha namorada Rafaela e à minha mãe Marli, pelo apoio e incentivo desde o início dos meus estudos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia, que por tantas vezes me ajudaram, especialmente ao Caio, à Sandra e à Alessa.

À minha amiga adorável, Nicolli, que, com seu humor grandioso, me levantava o ânimo nas vezes em que estava desanimado, me achando incapacitado para meu trabalho diário.

À FAPEMIG e a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim agradeço a todos por terem me ajudado, mesmo que indiretamente, para que eu concluísse esse trabalho.

*Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim.*

**Chico Xavier**

## RESUMO

O ácido linoléico conjugado, do inglês “Conjugated Linoleic Acid” (CLA) é uma mistura de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico (C18:2 n-6), comumente encontrado em maiores concentrações na carne bovina e em produtos lácteos de ruminantes. Numerosas atividades biológicas têm sido atribuídas aos isômeros C18:2 *cis-9, trans-11(c9t11)* e ao C18:2 *trans-10, cis-12 (t10c12)* dentre as quais destacam-se: propriedades anticarcinogênica, antiaterogênica, antiobesogênica, incluindo aumento da massa magra em animais, retardo do aparecimento de diabetes tipo II e também nas respostas imunes humoral e celular. O presente trabalho focou na utilização do *c9t11* na dieta em camundongos da linhagem BALB/c, avaliando efeitos na resposta imune humoral como a produção anticorpos específicos para ovalbumina (OVA), bem como a síntese de citocinas e respostas à hipersensibilidade tardia (HTT). O trabalho mostrou que o CLA na dieta reduziu efeitos nas respostas de HTT em 24 horas nos animais e estes apresentaram altos níveis de Ac anti- IgG1 e supressão no perfil Th1 de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Com base nesses resultados foi possível perceber que o CLA foi um importante fator no controle do processo inflamatório do modelo e que seu uso poderia ser considerado como uma importante intervenção profilática para muitas doenças de natureza inflamatória.

Palavras-chave: Ácido Linoléico Conjugado (CLA), ovalbumina (OVA), hipersensibilidade tipo tardia (HTT).

## ABSTRACT

Conjugated Linoleic Acid (CLA) is a mixture of positional and geometrical isomers of linoleic acid (C18:2 n-6), commonly found in high concentrations in bovine meat and lacteous products from ruminants. Numerous biological activities have been attributed to C18:2 *cis*-9, *trans*-11(*c9t11*) and C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (*t10c12*) isomers, among which anti-carcinogenic, anti-aterogenic, anti-obesity properties must be highlighted, including increase of thin mass in animals, delay in type II diabetes emergence and also in humoral and cellular immune responses. This work focused on the use of *c9t11* in the diet of BALB/c mice, evaluating effects on humoral immune response by means of production of ovalbumin (OVA) specific antibodies, cytokine production and responses to delayed type hypersensitivity (DTH). The results showed that using CLA in the diet of BALB/c mice decreased effects on DTH responses in a 24h period after animals had been challenged. They exhibited high levels of Ab anti-IgG1 and suppression of Th1 profile cytokines such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Based on these results, it was possible to say that CLA was an important factor of control in the inflammatory process of the model and that its use could be considered as an important prophylactic intervention for many diseases of inflammatory nature.

Keywords: Conjugated Linoleic Acid (CLA); ovalbumin (OVA); Delayed Type Hypersensitivity (DTH).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do ácido linoléico <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 (A) e dos seus isômeros conjugados CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 ( <i>c9t11</i> ) (B) e CLA <i>trans</i> 10, <i>cis</i> -12 (C) .....	18
Figura 2	Rotas metabólicas para a formação de isômeros de CLA a partir dos ácidos oléico, linoléico e $\alpha$ -linolênico .....	22
Figura 3	Vias 1 e 2 de síntese do CLA <i>c9t11</i> nos ruminantes e a incorporação dos isômeros na gordura do leite e na carne (A) .....	23
	Resumo esquemático das vias de produção do CLA no leite (B).....	24
Figura 4	A resposta imune na HTT a ovalbumina (OVA).....	28
Figura 5	Resultados patológicos e protetores da imunidade mediada por células.....	29
Figura 6	Resumo cronológico do modelo de HTT a OVA .....	43
Figura 7	Peso dos camundongos durante as 4 semanas de dieta (A). Consumo de dieta pelos grupos experimentais (B), * $P < 0,05$ quando compara-se (Controle/ HTT com HTT-MC/ HTT-CLA).....	48
Figura 8	Reação da Hipersensibilidade tipo Tardia (HTT) a OVA. A espessura do coxim plantar dos camundongos foi medida 24 horas após o desafio com OVA. * $P < 0,05$ quando compara-se HTT-MC com HTT e ** $P < 0,001$ quando compara-se HTT-CLA com HTT .....	49

Figura 9 Níveis séricos de IgG Total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). O soro dos animais foram avaliados quanto a presença dos anti-corpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-OVA após 8 dias da imunização.\* P<0,05 quando compra-se ao grupo HTT. \*\* P<0,001 quando compara-se ao grupo HTT..... 51

Figura 10 Níveis de citocinas como (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10, (C) TGF- $\beta$  e (D) IFN- $\gamma$ , IL-10 avaliados por ELISA após 8 dias de imunização com OVA . \* P<0,05 quando compara-se HTT com HTT-MC e HTT com HTT-CLA ..... 53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de ácido linoléico conjugado (CLA) no leite, em produtos lácteos e carnes.....	19
Tabela 2	Classificação das diversas respostas de hipersensibilidades.....	26
Tabela 3	Componentes e suas concentrações na massa total das rações para os grupos manteiga testados.....	39
Tabela 4	Composição das rações industrializadas. Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes S/A).....	40
Tabela 5	Grupos experimentais. Tipo de tratamento e dieta oferecida.....	42
Tabela 6	Perfil de ácidos graxos nas amostras de peletes e manteigas.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>AG</b>	Ácidos Graxos
<b>AL</b>	Ácido Linoléico
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>c9t11</b>	Isômero cis-9 trans-11 do CLA
<b>CAAs</b>	Células apresentadoras de Antígenos
<b>CFA</b>	Adjuvante de Freund completo
<b>CLA</b>	Ácido Linoléico Conjugado
<b>DTH</b>	Do inglês- " <i>Delayed Type Hypersensitivity</i> "
<b>GM-CSF</b>	Do inglês – " Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>H-2Ab<sup>0</sup></b>	Molécula do MHC classe II
<b>HTT</b>	Hipersensibilidade Tipo Tardia
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama – Citocina de perfil Th1
<b>Igs</b>	Imunoglobulinas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1 Ra</b>	Antagonista para o receptor de IL-1

<b>MC</b>	Manteiga comum
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PBS</b>	“Phosphate Buffered Saline”, Solução de Tampão Fosfato
<b>PBST</b>	PBS-Tween 20
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Do inglês – “PEROXISOME PROLIFERATOR ACTIVATED RECEPTOR GAMMA” – receptores nucleares
<b>PUFAs</b>	Do inglês – “ <i>Poly Unsaturated Fatty Acids</i> ” – Ácidos Graxos polinsaturados
<b><i>t10c12</i></b>	Isômero trans-10 cis-12 do CLA
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tumoral beta – citocina imunoregulatória
<b>Th</b>	T-helper
<b>TLR</b>	Do inglês – “Toll Like r Receptor”
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral – citocina de perfil Th1
<b>TVA</b>	Do inglês – “Trans-Vaccenic Acid ou Ácido trans vacênico
<b>TCR</b>	Do inglês – “ T cell’s Receptor” – Receptor da Célula T
<b><math>\Delta^9</math></b>	Enzima Delta- 9 dessaturase

## SUMÁRIO

<b>1 JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Ácido Linoléico Conjugado (CLA)</b> .....	16
2.1.1 Considerações gerais sobre os ácidos graxos .....	16
2.1.2 Características gerais do CLA .....	17
2.1.3 Fontes alimentares de CLA e fatores que influenciam sua distribuição nos alimentos .....	19
2.1.4 Produção de CLA .....	21
<b>2.2 Reações de Hipersensibilidade Tardia</b> .....	25
2.2.1 Considerações gerais sobre as reações de hipersensibilidade do tipo tardia .....	25
2.2.2 Reações de hipersensibilidade tipo tardia (HTT) .....	26
<b>2.3 Efeitos da dieta rica em ácidos graxos nas respostas imunológicas</b> .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	37
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
<b>4.1 Animais</b> .....	38
<b>4.2 Preparação das dietas</b> .....	38
<b>4.3 Análise do perfil de Ácidos Graxos nas amostras das rações por Cromatografia Gasosa</b> .....	41
<b>4.4 Delineamento Experimental</b> .....	41
4.4.1 Grupos experimentais e tratamentos .....	41
4.4.2 Indução do modelo de HTT à OVA .....	42
4.4.3 Medida da espessura das patas .....	43
4.4.4 Obtenção de material biológico .....	43
4.4.5 Detecção de anticorpo específico para OVA no soro .....	44
4.4.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante do homogenato do coxim plantar .....	44

4.4.7 Análises estatísticas.....	45
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1 Análise de ácidos graxos e principais precursores do isômero <i>c9t11</i> .....	46
5.2 Peso dos animais e consumo de dieta .....	47
5.3 Ação do CLA sobre o edema dos coxins plantares .....	49
5.4 Ação do CLA sobre os níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2a específica para OVA .....	50
5.5 AÇÃO DO CLA NOS NÍVEIS DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ ) .....	52
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 JUSTIFICATIVA

O ácido linoléico conjugado (CLA) consiste num grupo de ácidos graxos poliinsaturados da família ômega-6 derivados do ácido octadecadienóico do ácido linoléico (LA) (18:2n-6), obtidos por processos de biohidrogenação incompleta no rúmen e dessaturação na glândula mamária e em outros tecidos ou pela produção sintética.

Estudos experimentais empregando modelos animais tornaram evidentes várias aplicações potenciais do CLA para a saúde humana. Estes incluíram efeitos na redução de gordura corporal; no retardo do aparecimento de diabetes do tipo II e da evolução da aterosclerose; no aumento dos processos de mineralização dos ossos; e na modulação do sistema imunológico, entre outros. Isto resultou em exponencial aumento da investigação relacionada com CLA ao longo dos últimos anos, com objetivo de buscar alternativas para melhoria da qualidade de vida da população mundial.

Estudos tem mostrado que através da manipulação da dieta dos ruminantes, poderia modular o teor de CLA na gordura do leite, e neste caso, os dois isômeros mais estudados são o CLA *cis-9, trans-11* e o CLA *trans-10, cis-12*; e mais recentemente, a possibilidade de purificação dos isômeros do CLA, sugere que o isômero *cis-9 trans-11* do CLA possui propriedades modulatórias no sistema imune.

As hipersensibilidades são respostas exageradas do sistema imune a uma grande variedade de antígenos encontrados no ambiente e podem evoluir com sintomas leves, até doenças potencialmente letais, como por exemplo, as anafilaxias, doenças auto-imunes e também patologias desencadeadas por microorganismos intracelulares. A hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) é uma reação do sistema imune que ocorre geralmente num período entre 24 e 48 horas após o contato com o antígeno e é caracterizada por intenso infiltrado de monócitos e linfócitos T, que após ativação local mediada pelas células apresentadoras de antígenos (CAA), produzem citocinas como IFN- $\gamma$  que ativam macrófagos, provocando a inflamação local e formação de granulomas.

Algumas das doenças que cursam com a resposta de hipersensibilidade tardia são denominadas granulomatosas, tais como tuberculose, hanseníase, sífilis, esquistossomose, criptococose, paracoccidiodomicose, entre outras.

Considerando que as respostas de hipersensibilidade tardia são um conjunto de doenças inflamatórias de natureza local e que o CLA, principalmente o isômero *c9t11*, apresenta grande potencial imunomodulatório, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação deste ácido graxo sobre o quadro da hipersensibilidade do tipo tardia, mimetizado em modelo murino à ovalbumina (OVA).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

#### 2.1.1 Considerações gerais sobre os ácidos graxos

Os ácidos graxos (AG) são ácidos monocarboxílicos de cadeia hidrocarbonada longa sendo que os mais abundantes na natureza são os que possuem de 16 a 18 carbonos. São considerados nutrientes fundamentais na alimentação animal pelo grande potencial como fonte energética para as atividades fisiológicas como a respiração celular, além da participação na estrutura celular como os poliinsaturados que são base da estrutura de membranas, precursores para síntese de eicosanóides que funcionam como moduladores químicos em respostas inflamatórias, precursores de prostaglandinas e interleucinas (revisado por YAQOOB e CALDER, 2007; NELSON e COX, 2011).

De acordo com as ligações de carbono que possuem, os AG podem ser classificados como saturados e insaturados (mono e poliinsaturados). Os saturados possuem ligações de carbono covalentes simples (C-C), em geral encontrados em alimentos de natureza animal, sendo denominados como gorduras por serem sólidos em temperatura ambiente, pelo seu alto ponto de fusão. Já os insaturados apresentam ligações covalentes duplas (C=C) entre carbonos, em geral, estão presentes em alimentos de natureza vegetal, sendo denominados como óleos por serem líquidos em temperatura ambiente, devido ao baixo ponto de fusão (revisados por BRANDÃO *et al.*, 2005 e YAQOOB e CALDER, 2007, NELSON e COX, 2011).

Com relação à necessidade do organismo, os AG são classificados em naturais e essenciais. Os naturais são aqueles que o organismo é capaz de sintetizar em quantidade suficiente para atender a uma determinada função fisiológica. Um exemplo de AG natural para os seres humanos é o ácido oléico, sintetizado a partir do ácido esteárico, aparecendo no organismo como depósitos de gorduras e lipídios de membrana celular (revisado por MARTINS e GRUEZO, 2009; NELSON e COX, 2011). Os AG essenciais são aqueles que não podem ser sintetizados pelo organismo, para atender alguma exigência fisiológica, portanto devem ser consumidos através da dieta. Os dois principais AG essenciais para o

homem são o ácido linoléico (C18:2n-6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3) que tem como principais funções no organismo, manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos, assim como, a transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, a síntese da hemoglobina e a divisão celular (revisados por MARTIN *et al.*, 2006 e MARTINS e GRUEZO, 2009; NELSON e COX, 2011).

Os AG insaturados podem ser classificados em função da posição das insaturações entre as ligações de carbono logo após o grupo metílico final, em séries ômega ou ( $\omega$ ) 3, 6 e 9. Os principais representantes da família  $\omega$  3 são o ácido  $\alpha$ -linolênico, o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosaexaenóico, da família  $\omega$  6 são o ácido linoléico e o ácido araquidônico e  $\omega$  9 o ácido oléico sendo este um ácido graxo natural (revisado por ANDRADE e CARMO, 2006).

As principais fontes de AG essenciais são as plantas terrestres e aquáticas (marinhas), e destes, o ácido linoléico pode ser encontrado em grande abundância nas sementes de plantas oleaginosas, principalmente nos óleos de soja, milho, girassol e nas castanhas (revisado por ANDRADE e CARMO, 2006).

### 2.1.2 Características gerais do CLA

O ácido linoléico é um ácido graxo poliinsaturado, do inglês "*Polyunsaturated Fatty Acids*" (PUFA), da série  $\omega$  6, no qual diferentes combinações de seus isômeros de forma geométrica (configurações: *cis-cis*, *trans-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*) e posição de suas insaturações (dupla ligações nas posições 8 e 10; 9 e 11; 10 e 12; ou 11 e 13) formam o grupo dos Ácidos Linolêicos Conjugados ("*Conjugated Linoleic Acids*", CLA) (revisados por BESSA *et al.*, 2000; ROCHE *et al.*, 2001; AYDIN, 2005; DHIMAN *et al.*, 2005 e COLLOMB *et al.*, 2006).

Esse grupo de compostos foi descoberto em 1979 por pesquisadores americanos que observaram efeitos anticarcinogênicos em grelhados de carne bovina, ou de isomerização catalisada do ácido linoléico, inibiam quimicamente a indução de uma neoplasia de pele em camundongo. que foram identificados como isômeros octadecadienóicos do ácido linoléico, ou seja, CLA. Desde então, este grupo de substâncias vem sendo objeto de grande número de estudos, representando um novo e extenso campo de pesquisa dos ácidos graxos, por sua

relação com a saúde humana (revisados por COOK e PARIZA, 1998 e FUNCK *et al.*, 2006).

As duas ligações duplas dos isômeros de CLA são conjugadas existindo em todas as possíveis configurações geométricas, assim, possibilitando a formação de muitos isômeros (revisado por COLLOMB *et al.*, 2006). Dentre todas as possíveis combinações, até então na grande maioria das pesquisas utilizando animais, ou até mesmo seres humanos, dois isômeros tem demonstrado importantes bioatividades: os isômeros (C18:2) *trans*-10 *cis*-12 (*t10c12*) e o (C18:2) *cis*-9 *trans*-11 (*c9t11*). As estruturas químicas destes isômeros são mostradas na Figura 1.

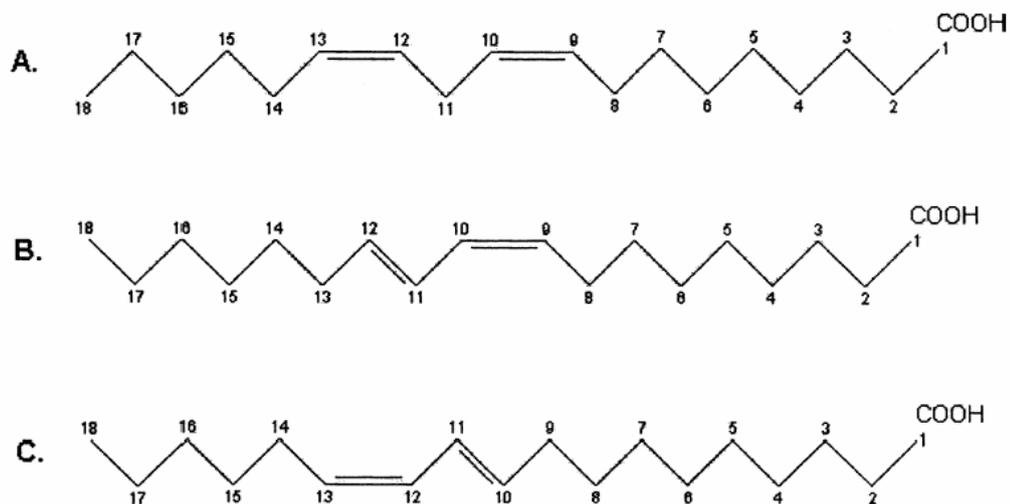


Figura 1. Estrutura química do ácido linoléico *cis*-9, *cis*-12 (*c9c12*) (A) e dos seus isômeros conjugados CLA *cis*-9, *trans*-11 (*c9t11*) (B) e CLA *trans*-10, *cis*-12 (*t10c12*) (C). Fonte: Adaptado de Dhiman *et al.*, 2005.

Em relação às atividades biológicas, o CLA tem se destacado, principalmente em modelos animais, atuando contra o câncer de pele, cólon, mama, estômago e fígado (revisados por BHATTACHARYA *et al.*, 2006 e KELLEY *et al.*, 2005), aterosclerose (revisado por BHATTACHARYA *et al.*, 2006; KRITCHEVSKY *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005; revisado por KELLY e BAUMAN, 1999), diabetes (MOLONEY *et al.*, 2007), obesidade e também na resposta imune a patógenos (PARK e PARIZA, 2007).

Além disso, os isômeros de CLA, especialmente o isômero *c9t11* atua na modulação da resposta inflamatória, sendo importante na prevenção e no tratamento de patologias granulomatosas, como: tuberculose, hanseníase, sífilis, esquistossomose, criptococose, paracoccidiodomicose, entre outras. (FA *et al.*, 2005; revisado por REYNOLDS e ROCHE, 2010).

### 2.1.3 Fontes alimentares de CLA e fatores que influenciam sua distribuição nos alimentos

Os isômeros do CLA ocorrem naturalmente em muitos alimentos, sendo que 18 são normalmente identificados nas fontes disponíveis comercialmente, e destes, os dois principais, são *c9t11* e o *t10c12*, constituindo cerca de 80% do CLA total (revisado por JOO *et al.*, 2007).

O isômero *c9t11* compreende cerca de 75-90% do CLA total na gordura do leite quando comparado com outras fontes de gordura na natureza, a exemplos dos vegetais, peixes, suínos e aves (revisado por DHIMAN *et al.*, 2005). Na Tabela 1, podemos observar a concentração de CLA total e do isômero *c9t11* em alguns alimentos que normalmente compõem a dieta humana.

Tabela 1. Concentração de ácido linoléico conjugado (CLA) no leite, em produtos lácteos e carnes.

<b>Alimentos</b>	<b>Total de CLA (% de gordura)</b>	<b>CLA <i>cis</i>-9, <i>trans</i>-11 (% do total de CLA)</b>
Leite UHT	0,80	-
Leite homogeneizado	0,55	92
<b>Produtos Lácteos</b>		
Leite Condensado	0,63-0,70	82
Queijo Cheddar	0,40-0,53	78-82
Queijo Cottage	0,45-0,59	83
Queijo Mussarela	0,34-0,50	78-95
Manteiga	0,47-0,94	78-88
Iogurte integral	0,38-0,88	83-84
Iogurte <i>light</i>	0,44	86
Sorvete	0,36-0,50	76-86
<b>Carnes</b>		
Carne bovina moída	0,16-0,43	72-85
Carne de vitelo	0,27	84
Carne suína	0,06-0,13	25-82
Carne de frango	0,09-0,15	67-84
Carne de peru	0,20-0,25	40-76

Fonte: Adaptado de Dhiman *et al.*, 2005.

A distribuição do CLA nos alimentos é diferenciada devido a alguns fatores, principalmente as condições de manutenção e manejo do gado, a idade e a dieta oferecida, sendo esta última, o fator mais importante (revisado por DHIMAN *et al.*, 2005). Nos produtos derivados dos ruminantes, a concentração e a distribuição de isômeros do CLA dependem dos processos da síntese endógena como a biohidrogenação ruminal e a dessaturação pela enzima estearoil-CoA dessaturase ou 9 dessaturase ( $\Delta^9$ ) nos tecidos, que isomeriza a ligação dupla *c12* para a *t11* do *c9t12*, reduzido-o em ácido *trans*-vacênico (TVA, C18:1 *t11*). Assim observa-se que estes processos podem ser afetados principalmente pela composição, tipo da dieta e pela população microbiana no rúmen (revisado por KRAMER *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2005).

Em relação ao manejo do gado, bem como o tipo da dieta oferecida, foi observado que há um aumento nas concentrações de CLA na gordura do leite de vacas manejadas em sistema de pastejo, isso pelo fato do capim fresco apresentar grandes concentrações de ácidos graxos como ácido linoléico e  $\alpha$ -linolênico, e que a silagem para preservação da forragem causa uma queda na concentração desses ácidos graxos pela microbiota residente na massa ensilada (ambiente anaeróbio), similar ao que ocorre no rúmen (revisado por TANAKA, 2005). Foi verificado que em vacas de pastejo, o CLA está concentrado em um valor de dois a cinco vezes a mais na gordura total do leite, quando comparadas às vacas alimentadas com um misto de rações de capim ensilado, adicionada com lipídios em teores semelhantes (DHIMAN *et al.*, 1999 *apud* TANAKA, 2005). Foi também observado que, as dietas suplementadas com lipídios na forma de óleos vegetais, como óleo de soja e de girassol, podem exercer maiores efeitos na concentração de CLA dos produtos provenientes de ruminantes, gerando uma produção respectiva de 2,13% e 2,44%, (revisado por DHIMAN *et al.*, 2005). Portanto, conclui-se que a composição de AG da dieta modula o perfil lipídico dos tecidos e fluidos como exemplo o leite.

As principais fontes de  $\omega$  6 como ácido linoléico, são os grãos de cereais e de oleaginosas (girassol, soja, milho, castanhas) bem como os óleos obtidos destes (revisado por BESSA *et al.*, 2000). Desse modo desejando-se elevar a concentração de CLA na gordura do leite, deve-se prover o rúmen de substratos como ácidos graxos poliinsaturados, como por exemplo, o ácido linoléico, objetivando alcançar a produção máxima não só de CLA, mas principalmente, de precursores como o ácido

trans-vacênico (TVA) (GRIINARI *et al.*, 2000). Essa estratégia de aumentar de forma natural o CLA no produto derivado de ruminante, além da diminuição do teor de gordura considerada de qualidade ruim no leite, melhora a imagem dos produtos lácteos junto ao mercado, já que o consumidor vem preferindo, alimentos mais saudáveis, de baixa caloria e sem aditivos (SANTOS *et al.*, 2001).

#### 2.1.4 Produção de CLA

O CLA pode ser originado de forma natural no rúmen, por meio da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta realizada por bactérias fermentativas ruminais como a *Butyrivibrio fibrisolvens*, e também, pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans-11* (BROW e MOORE, 1960; BAUMAN *et al.*, 2000; BAUMAN e GRIINARI, 2003; revisados por O'SHEA, 2004; DHIMAN *et al.*, 2005 e SCHMID *et al.*, 2006).

A biohidrogenação ruminal é um conjunto de reações de isomerização e hidrogenação dos ácidos graxos da dieta, tendo como produto final um ácido graxo saturado (C18:0). Na biohidrogenação, o isômero *c9t11* é o primeiro intermediário formado a partir do ácido linoléico pelas enzimas  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{11}$  *trans*-isomerases de microrganismos da flora ruminal, a partir de precursores como ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3),  $\gamma$ -linolênico (C18:3) ou o ácido linoléico (C18:2) (CORL *et al.*, 2001; revisados por DHIMAN *et al.*, 2005 e SCHMID *et al.*, 2006). Normalmente, a biohidrogenação ocorre de forma completa, porém alguns produtos intermediários podem atravessar o rúmen e serem utilizados na síntese de lipídios no tecido mamário e adiposos. Além disso, o CLA tem sido encontrado também em animais não ruminantes como porcos, galinha, peru e peixes (IP *et al.*, 1994).

Na segunda via de produção de CLA, o ácido graxo C18:1 *trans-11* sofre dessaturação pela enzima  $\Delta^9$  dessaturase presente na glândula mamária e no tecido adiposo, assim formando a síntese endógena (revisados por O'SHEA, 2004; DHIMAN *et al.*, 2005 e SCHMID *et al.*, 2006).

A dessaturação envolve uma série de reações realizada pela enzima  $\Delta^9$  que isomeriza a ligação dupla *c12* para a *t11*, e uma parte do CLA *c9t12* é rapidamente reduzida a ácido *trans*-vacênico (TVA, C18:1 *t11*), que tanto pode entrar na via de produção do *c9t11*, bem como de outros ácidos graxos (revisados por COLLOMB, 2006; DHIMAN *et al.*, 2005 e FUNCK *et al.*, 2006; GRIINARI *et al.*, 1998; KENNELLY e BELL, 2007; revisado por LAWSON *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a biohidrogenação e dessaturação são explicados com mais detalhes na figura 2.

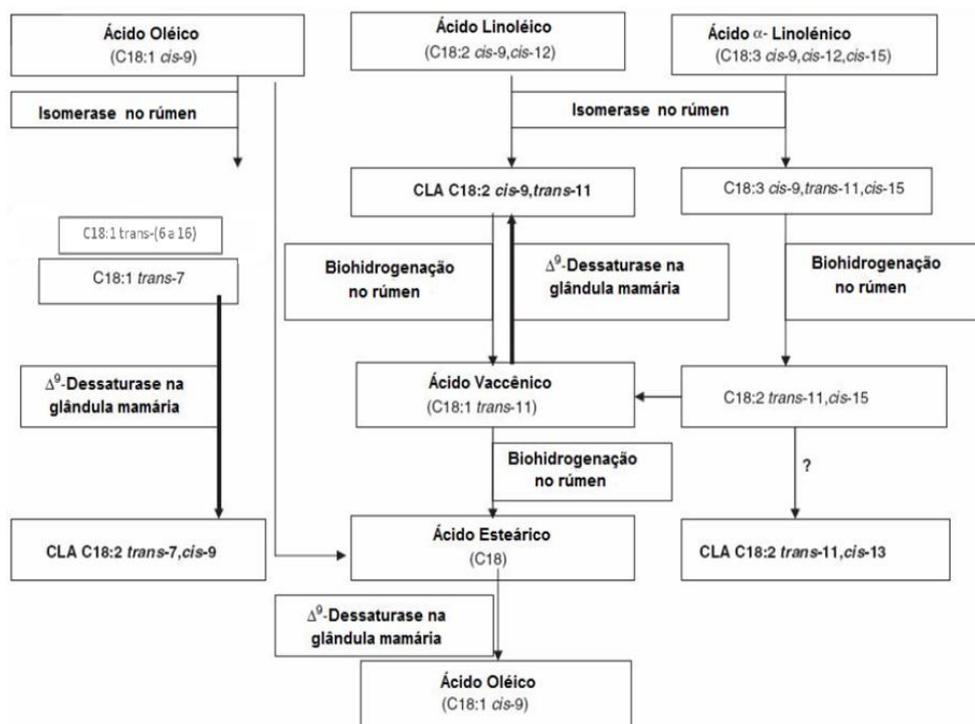


Figura 2. Rotas metabólicas para a formação de isômeros de CLA a partir dos ácidos oléico, linoléico e  $\alpha$ -linolênico. Fonte: Adaptado de Collomb *et al.*, 2006.

O fato de o *c9t11* ser encontrado em maiores proporções na gordura do leite e na carne bovina é explicado pelo fato de que pequenas quantidades do *c9t11* escapam da biohidrogenação ruminal junto ao precursor *trans*-vacênico (TVA), representando assim, um mecanismo principal de produção de CLA em maiores concentrações, nos produtos derivados de ruminantes. Os intermediários que escapam da biohidrogenação no rúmen são absorvidos no trato digestório e

transportado à glândula mamária via circulação (revisados por DHIMAN *et al.*, 2005 e TANAKA, 2005 ).

Na glândula mamária o ácido trans-vacênico (C18:1 trans-11), pode sofrer dessaturação pela enzima  $\Delta^9$ , e assim ser convertido em *c9t11*, caracterizando a síntese endógena, sendo responsável pela maior fração de *c9t11* na gordura do leite (revisado por DHIMAN *et al.*, 2005).

A Figura 3 (A) demonstra as vias 1 e 2 de síntese do CLA *c9t11* nos ruminantes e a incorporação dos isômeros na gordura do leite e na carne. A figura 3 (B) demonstra o resumo destas vias.

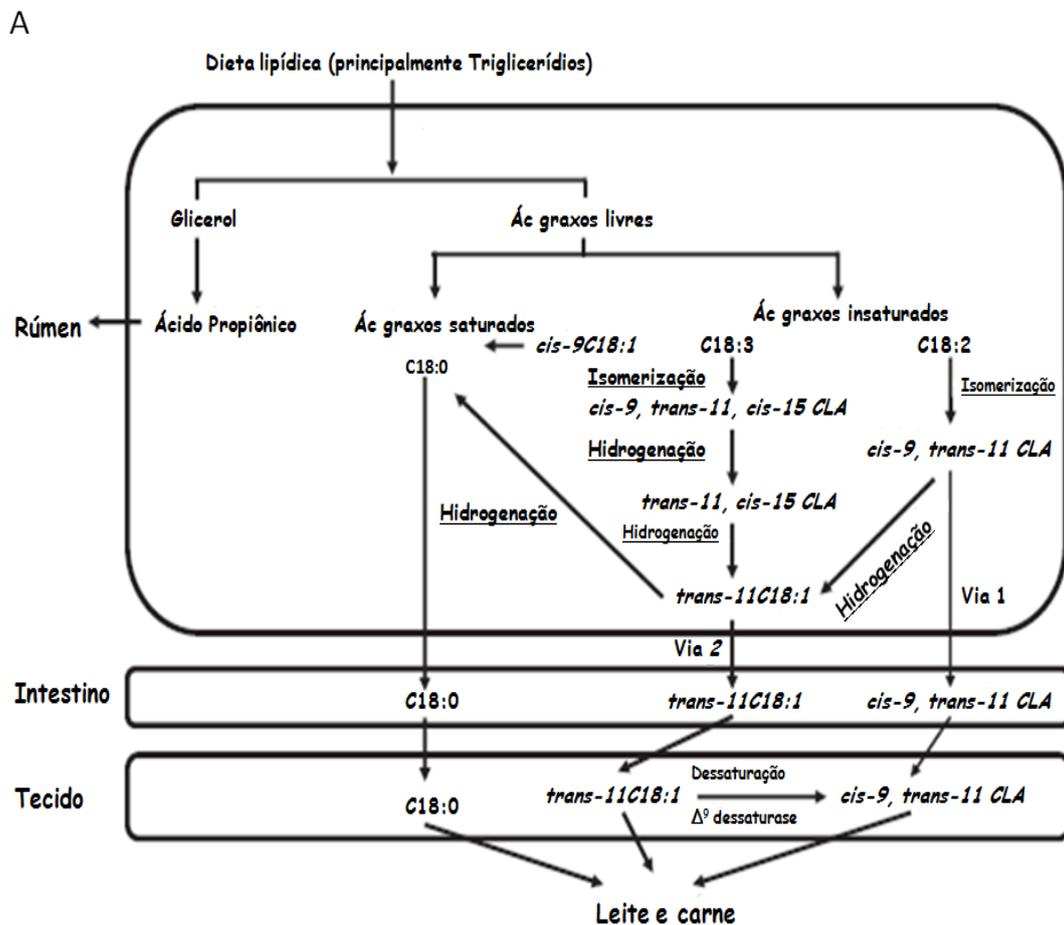


Figura 3 (A). Vias 1 e 2 de síntese do CLA *c9t11* nos ruminantes e a incorporação dos isômeros na gordura do leite e na carne. Adaptado de Tanaka, 2005.

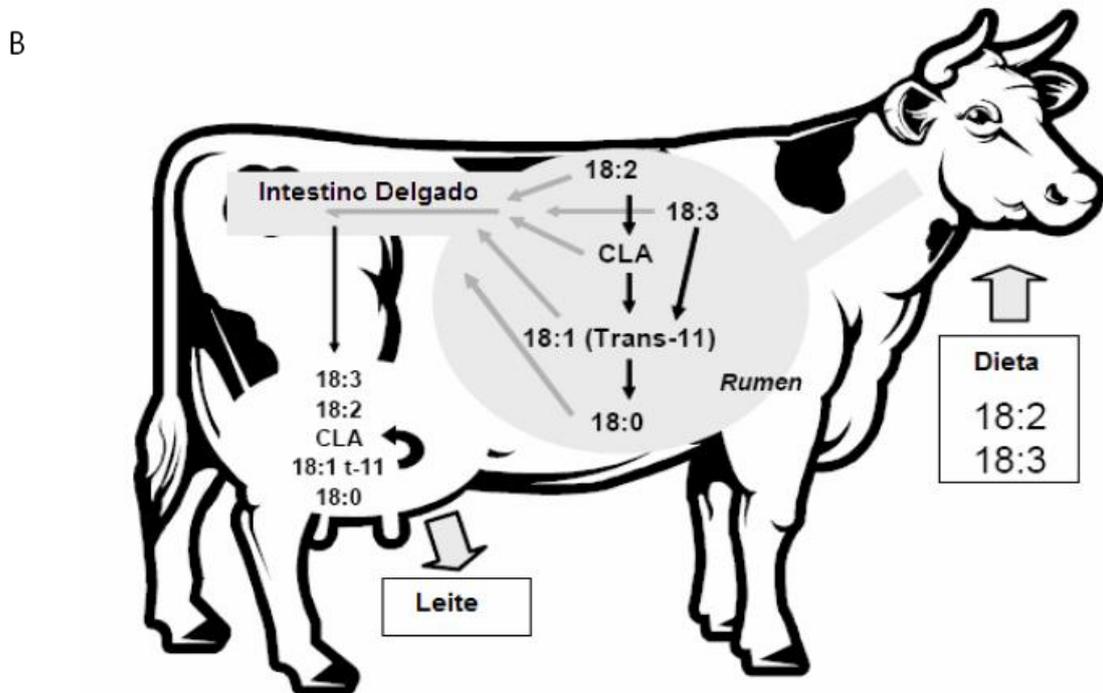


Figura 3 (B). Resumo esquemático das vias de produção do CLA no leite. Adaptado de Kennelly e Bell, 2007.

Além da produção natural ou endógena nos ruminantes, os isômeros de CLA podem também ser sintetizados em laboratório por reação de catálise alcalina com uso do ácido linoléico como substrato (revisado por BELURY, 2002; FUNCK *et al.*, 2006) ou por meio de reações de isomerização alcalina e de isomerização em propilenoglicol, a partir de fontes como o óleo de girassol, de soja e de milho que são ricos em ácido linoléico (revisado por DHIMAN *et al.*, 2005). É importante denotar que a produção sintética tem como ponto positivo a seu favor, pois seu objetivo é a obtenção de um produto de composição definida e com máxima atividade biológica (FUNCK *et al.*, 2006; revisado por PARIZA *et al.*, 2001) onde a concentração total e a distribuição de seus isômeros deverão ser parâmetros de qualidade mais importantes nos produtos destinados à comercialização (FUNCK *et al.*, 2006).

## 2.2 Reações de Hipersensibilidade

### 2.2.1 Considerações gerais sobre as reações de hipersensibilidade

A imunidade é um estado de resistência ou proteção contra inúmeros agentes agressores ao organismo, sejam eles substâncias ou microrganismos, e essa defesa só é possível devido a composição e a interação dos componentes do sistema imune (revisado por KELLEY, 2001). O contato com o sistema imune pode não somente estabelecer uma resposta imune protetora, como também pode causar danos aos tecidos como doenças auto-imunes, inflamatórias crônicas, hipersensibilidades entre outras (revisado por KOBAYASHI *et al.*, 2001).

As respostas imunes resultantes do contato dos antígenos exógenos são expressas de formas variadas que vão de sintomas leves, como pruridos na pele a doenças potencialmente fatais como as anafilaxias.

Essas variadas formas de reações são conhecidas como reações de hipersensibilidades e essas podem ser iniciadas pela interação do antígeno com anticorpos do sistema imune humoral ou por mecanismos mediados por células (COTRAN *et al.*, 1999; GALLI & LANTZ, 1999). A tabela 2 classifica os 4 tipos de reações e exemplifica com diferentes tipos de patologias que são desencadeadas por estas reações de hipersensibilidades.

Tabela 2. Classificação das diversas respostas de hipersensibilidades.

<b>Tipo</b>	<b>Componentes imunes envolvidos</b>	<b>Exemplos</b>
Tipo I Anafilático	IgE e mastócitos	Urticária, Alergia pulmonar, Alergia alimentar
Tipo II Citotóxica	IgG, IGM, complemento, células citotóxicas	Pênfigo, Eritroblastose fetal, Anemia hemolítica autoimune
Tipo III Doença de Imunocomplexo	Imunocomplexos complemento	Reação de Arthus, Doença do soro, Glomeronefrite, Lúpus Eritromatoso Sistemico
Tipo IV Hipersensibilidade Tipo Tardia (DTH)	Linfócitos T, macrófagos, citocinas, quimiocinas	Doenças granulomatosas: Tuberculose, Hanseníase, Dermatite de contato ou Citotoxicidade direta por células

(Adaptado de GALLI &amp; LANTZ, 1999).

### 2.2.2 Reações de hipersensibilidade tipo tardia (HTT)

As reações de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) ou “*Delayed Type Hypersensitivity*” (DTH) se caracterizam por uma resposta inflamatória local exarcebada envolvendo ativação de células T com produção de citocinas e quimiocinas (FIELD *et al.*, 2009). Dependendo de como os antígenos são processados e apresentados, as reações de hipersensibilidade do tipo tardia podem ser mediadas tanto pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> quanto pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (revisado por KALISH, 1999).

As reações de HTT são basicamente iniciadas quando a célula apresentadora de antígeno (CAA) (macrófago, célula dendrítica ou célula B) apresenta o antígeno, no caso a Ovalbumina (OVA) às células T, constituindo a fase de sensibilização. As células B quando ativadas pelo antígeno, secretam anticorpos e as células T auxiliares ( $Th_0$ ) serão então diferenciadas em células T auxiliar 1 ( $Th_1$ ) e 2 ( $Th_2$ ). Em uma segunda exposição ao antígeno (fase de desafio), se a apresentação de antígenos pelas CAA for direcionada aos clones de linfócitos  $Th_1$ , uma maior secreção de interleucina (IL) 12 pelas CAA, junto com a secreção de citocinas como IL-3 e GM-CSF é induzida a hematopoiese de granulócitos e monócitos, bem como, a ativação e atração de macrófagos para o sítio inflamatório, intensificando ainda mais a resposta. O  $IFN-\gamma$  derivado dos clones  $Th_1$  e o  $TNF-\alpha$ , e IL-1 derivados de macrófagos, atuam em células endoteliais vizinhas, provocando alterações vasculares e teciduais, facilitando o extravasamento celular, provocando um aumento na espessura tecidual e endurecimento, podendo ser avaliado (fase de leitura). A intensidade do processo inflamatório é então amplificada com o desafio e atenuada pela atividade das células T regulatórias (revisados por KOBAYASHI *et al.*, 2001 e HAWRYLOWICZ e O'GARRA, 2005).

O resultado final dessas reações é a inflamação e edema no local e os picos inflamatórios que podem ocorrer no período de 18 à 72 horas após o desafio, sendo o infiltrado celular composto tipicamente por células mononucleares e polimorfonucleares (CHEN *et al.*, 2005; ISHIGAME *et al.*; 2006; KIM e MOUDGIL, 2008; ZHANG, 2009). O modelo de resposta imune em relação às reações de HTT à OVA está esquematizado na Figura 4.

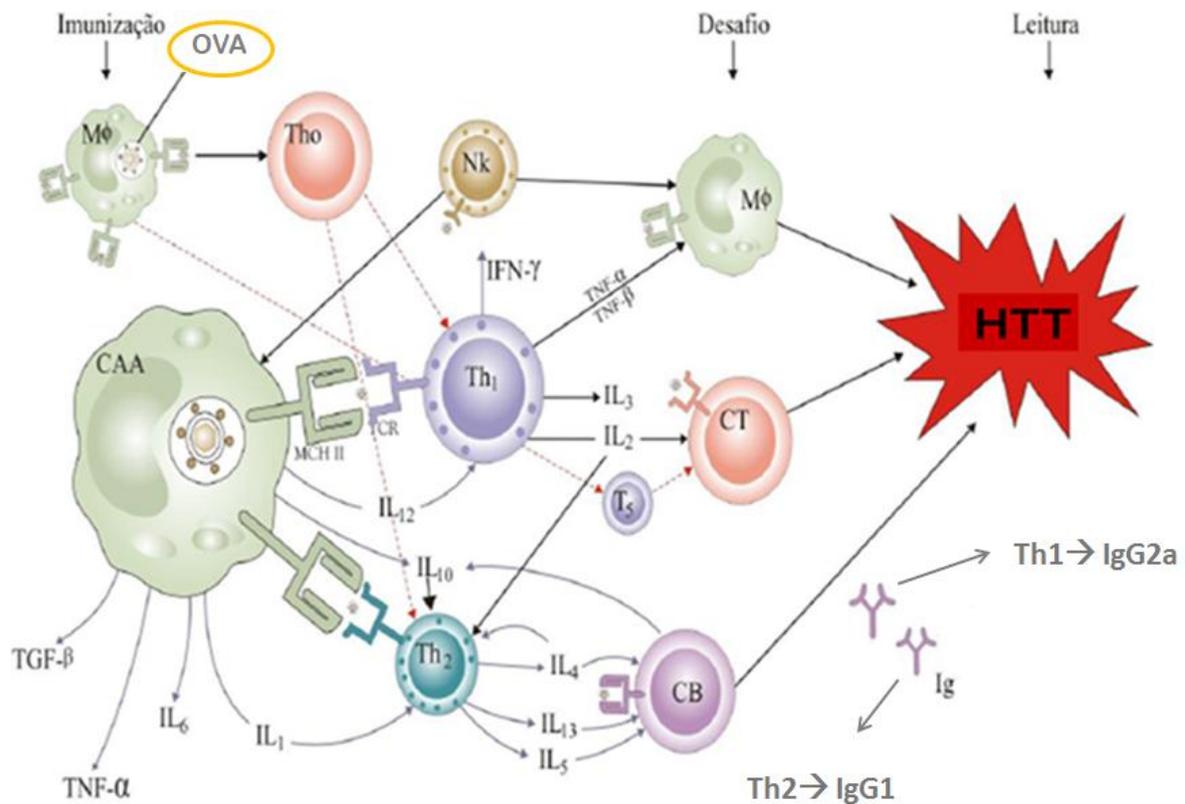


Figura 4. Resposta imune envolvida na reação de HHT à ovalbumina (OVA). Fonte: adaptado de ANDRADE, 1997. Célula apresentadora de antígenos (CAA), macrófago (Mφ), célula B (CB), célula T auxiliar (Th), célula T supressora (Ts), célula natural killer (NK).

Alguns estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de compreender o papel do infiltrado inflamatório e qual a importância das células e das citocinas envolvidas na destruição tecidual (BETTINI e VIGNALI, 2009; HOFFMAN, 2009). Foi sugerido que a destruição tecidual não é apenas o resultado da manutenção da resposta, mas também de alterações e de desequilíbrios no sistema imune (IWASAKI e MEDZHITOV, 2010). Assim entende-se que as reações de HHT podem desenvolver tanto um papel benéfico/protetor, como também ser a causa de muitas patologias como inflamações granulomatosas, calcificação, necrose e formação de cavidades; e dessa forma, representam também uma via patológica das respostas imunes mediadas por células como tuberculose, hanseníase, sífilis, esquistossomose, criptococose, coccidioidomicose, entre outras (revisado por KOBAYASHI *et al.*, 2001). Essa dualidade da ação da HHT é esquematizada na figura 5.

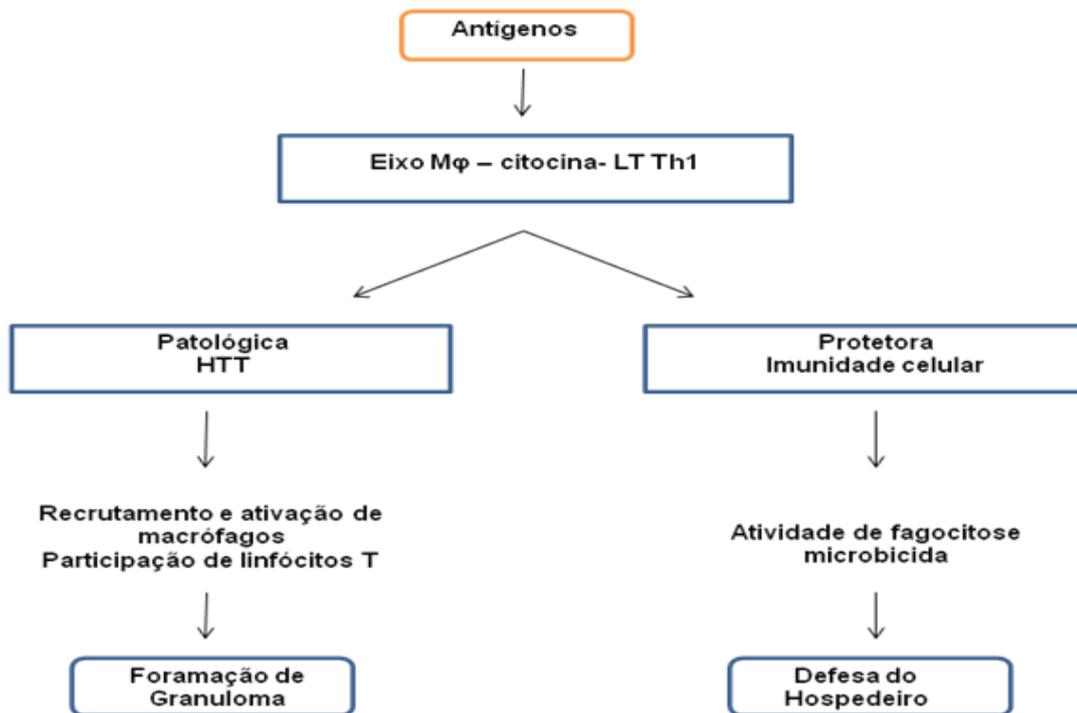


Figura 5. Resultados patológicos e protetores da imunidade mediada por células. Adaptado de KOBAYASHI *et al.*, 2001.

Pesquisas com modelos experimentais têm sido utilizadas como alternativas para estudos relacionados a tratamentos e até mesmo prevenção de muitas patologias, que afetam principalmente a população mundial (revisado por BREHM *et al.*, 2010). Destes inúmeros trabalhos, uma grande quantidade tem objetivado principalmente avaliar a resposta imune, que podem ser desencadeadas frente à diversos fatores químicos, físicos e biológicos, e que venham desencadear importantes efeitos imunomodulatórios (revisado por BREHM *et al.*, 2010).

A reação de HTT à ovalbumina (OVA), bem como, a sensibilização aérea à OVA são dois exemplos comuns, de muitos trabalhos que se tem proposto para avaliar muitas das características de determinadas patologias que são desenvolvidas pela resposta imune.

Foi demonstrado que uma dieta rica em ácidos graxos  $\omega 6$  e  $\omega 3$  podem promover diferentes efeitos na resposta imune em modelos de alergia e de vacinação ao vírus influenza, respectivamente. Com relação às respostas de HTT frente ao modelo de vacinação, camundongos C57BL/6, mantidos sob dieta rica em

$\omega$ 3 (óleo de peixe), foram vacinados e desafiados na orelha com Influvac, nas doses de 100  $\mu$ L e 25  $\mu$ L respectivamente. Os animais tiveram a resposta de HTT realçada contra a vacina, o que poderia indicar uma resposta imune celular mais eficiente contra antígenos virais, e que a dieta com ácidos graxos  $\omega$ 3 poderia ser considerada como fonte de potenciais benefícios, já que tem sido demonstrada agir preferencialmente sobre a resposta imune de perfil Th1, reduzindo e ou controlando muito dos efeitos inflamatórios decorrentes de infecções desencadeadas por diversos patógenos (VLIES *et al.*, 2011).

Johansson *et al* (2011) utilizando um modelo de hipersensibilidade á OVA em camundongos BALB/c, observaram que quando os animais foram alimentados com óleo de peixe durante 21 dias, tiveram uma redução significativa da reação de HTT, bem como, uma menor proliferação de linfócitos T OVA específicos, assim como também, reduzidos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6.

Nos dois trabalhos descritos acima foi demonstrado que a dieta rica em AG  $\omega$ 6 tem por ação específica sobre o modelo Th2 (sensibilização alérgica de vias aéreas), reduzindo níveis de IgE total e específico no soro dos animais, bem como, a uma redução nos níveis de eosinófilos no lavado broncoalveolar ( JOHANSSON *et al.*, 2011 e VLIES *et al.*, 2011).

### **2.3 Efeitos na Dieta Rica em Ácidos Graxos na Resposta Imune**

O desenvolvimento, a manutenção e bom funcionamento do sistema imune são dependentes de uma alimentação equilibrada e adequada, e a deficiência ou o excesso de uma série de nutrientes pode ter efeitos adversos. Os nutrientes com efeitos mais pronunciados sobre o sistema imune são os ácidos graxos; vitaminas A, B6, B12, C, E e minerais como zinco, cobre, selênio e ferro (revisado por KELLEY, 2005).

Os ácidos graxos (AG) são conhecidos por desempenhar diversos papéis em células do sistema imune. Além de serem importantes como fonte de energia, como componentes estruturais das membranas celulares, moléculas sinalizadoras e precursores para síntese de eicosanóides, foi sugerido por pesquisas recentes que os AG dependendo de sua localização e organização em diferentes grupos

celulares, poderiam ter diferentes influências diretas sobre o comportamento de uma série de proteínas envolvidas nos processos de ativação das células do sistema imune, como os linfócitos T e células envolvidas na apresentação de antígenos, como por exemplo macrófagos e células dendríticas (revisado por YAQOOB e CALDER, 2007).

Alguns trabalhos discutem que a dieta rica em AG poderia modular as respostas imunes através de três mecanismos moleculares, ou seja, alterações na estrutura e funções das membranas celulares; a produção de eicosanóides e a produção de citocinas (revisados por YAQOOB e CALDER, 2007; FRITCHE, 2006; KELLEY, 2005; CALDER, 2003; STULNIG, 2003 e MEAD *et al.*, 1978).

Em uma primeira fase, surgia várias hipóteses de que certas gorduras na dieta induziria alterações nas membranas das células do sistema imune, alterando a composição e a fluidez. Com o tempo esta teoria não foi favorecida pelo fato de que os AG poliinsaturados ômega-3 e ômega-6, teriam propriedades diferenciadas, até mesmo algumas contraditórias sobre o sistema imune. Porém esta teoria ressurgiu com descoberta de certos domínios lipídicos discretos nas membranas celulares, conhecidos com “lipid rafts” e assim, várias hipóteses foram levantadas se os AG poliinsaturados poderiam modular a composição dos “lipid rafts” em células como linfócitos T, alterando os mecanismos de sinalização pelo seu receptor de membrana (TCR). (revisado por FRITCH, 2006).

Em uma segunda fase, muitos trabalhos tiveram como objetivo, definir qual seria o papel dos AG na síntese de eicosanóides sobre a resposta imune. Os eicosanóides são representantes de uma família de metabólitos oxigenados derivados do ácido aracônico (AA), conhecidos como atuantes mediadores da inflamação, representados por moléculas como prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos (revisados por FRITCH, 2006 e ANDRADE e CARMO, 2006). A liberação de eicosanóides é estimulada por várias substâncias como citocinas, complexos antígeno-anticorpo, fatores de crescimento, radicais livres, colágeno e bradicinina (CALDER, 2010).

No sistema imune, os eicosanóides atuam regulando a atividade celular principalmente na alteração dos níveis de AMPc. É observado que um aumento nos níveis de AMPc levam a imunossupressão e um decréscimo das respostas inflamatórias; como por exemplo a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que induz um aumento nos níveis de AMPc em linfócitos T, linfócitos B, “Natural Killers” (NK), diminuem a

apresentação de antígenos por macrófagos peritoneais, bem como atividades fagocíticas, quimiotaxia celular e síntese de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (revisado por SWEENEY *et al.*, 2005). Assim acredita-se que uma modulação sobre os padrões de mediadores lipídicos pode diminuir os efeitos da resposta imune/inflamatória. Estudos com animais mostraram uma relação direta entre o teor de ácido aracdônico (AA) em fosfolipídios de membrana das células inflamatórias, e a capacidade destes em produzir PGE2, visto que há um aumento na produção de PGE2 quando o AA é adicionado na dieta, e uma redução expressiva de PGE2 quando adiciona-se na dieta precursores de AG  $\omega$  6 e  $\omega$  3 principalmente (revisado por CALDER, 2010). Além disso, com relação aos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA)  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6, foi demonstrado que os da família  $\omega$ 6 dão origem preferencialmente, a eicosanóides pró-inflamatórios e estimulam a proliferação de linfócitos Th<sub>2</sub>, enquanto que os ácidos graxos da família  $\omega$ 3 estimulam mais uma resposta Th<sub>1</sub>, células Tregs, e eicosanóides menos potentes (SIMOPOULOS, 2002 *apud* VLIES *et al.*, 2011).

Em terceira fase, consiste na relação entre os AG da dieta sobre a síntese de citocinas, bem como, na modulação da resposta imune/inflamatória. Assim alguns trabalhos utilizando dietas enriquecidas com ácidos graxos da família  $\omega$  3 e  $\omega$  6, tem demonstrado importante influência sobre a resposta imune principalmente sobre aquelas de caráter inflamatório, com redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (revisados por O'SHEA *et al.*, 2004; ANDRADE E CARMO, 2006 e PARK *et al.*, 2007 ).

A influência da dieta rica em ácidos graxos na função imune foi primeiramente estudada por Mead e Mertin (1978), cujo enfoque deu-se nos efeitos dos ácidos graxos na proliferação *in vitro* de linfócitos (FUNCK *et al.*, 2006). Desde então, os ácidos graxos, incluindo o CLA, tem sido avaliado e diversas atividades biológicas foram demonstradas em culturas de células humanas e em modelos animais de diversas patologias (revisados por BENJAMIN e SPENER, 2009 e KELLEY, 2005).

A primeira atividade biológica apresentada pelo CLA foi a anticarcinogênica (revisado por AYDIN, 2005), além disso foi demonstrado em modelos animais que o isômero *c9t11* foi responsável por esta atividade (ROACH *et al.*, 2002) . Segundo a revisão de Pariza e colaboradores (2001) o isômero *c9t11* mostrou-se ser

importante na diminuição da ocorrência de neoplasia mamária, havendo indícios de interação sinérgica com o isômero *t10c12*.

Devido à existência de vários isômeros do CLA é importante notar que cada isômero pode promover diferentes atividades biológicas, ou mesmo trabalhar sinergicamente. Os efeitos benéficos à saúde humana tem sido atribuídos, principalmente, aos isômeros *c9t11* e *t10c12* (revisados por AYDIN, 2005 e BHATTACHARYA *et al.*, 2006), sendo importantes na resposta imune, modulando a síntese de anticorpos, citocinas, quimiocinas e mediadores da imunidade inata, como os eicoisanóides, e ação na resposta imune à diferentes mitógenos (revisado por O'SHEA *et al.*, 2004; SANTANA *et al.*, 2009).

Em um trabalho utilizando um modelo experimental de Lúpus Eritematoso Sistêmico, onde os camundongos foram submetidos a uma dieta enriquecida com mistura de 2 isômeros do CLA (40% *c9t11* e 45% *t10c12*), houve uma redução na produção de IFN- $\gamma$  e na proliferação de esplenócitos. Além disso, a dieta durante longo prazo reduziu consideravelmente os sinais característicos desta patologia como esplenomegalia, produção de auto-anticorpos, e síntese de citocinas como IL-4 e IL-10 (BERGAMO *et al.*, 2006).

Em um trabalho utilizando um modelo com ratos geneticamente propensos a obesidade (ratos Zuck *fa/fa*), foi verificado que o CLA contido na dieta durante 8 semanas exerceu efeitos positivos sobre a resposta imune. Neste modelo experimental, foi observado que nos meios de cultura de células esplênicas estimuladas com diferentes mitógenos como ConA e LPS, houve redução de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-2, e IFN- $\gamma$ , quando comparado ao controle. Assim concluíram que os isômeros *c9t11* e *t10c12* modulam a resposta inflamatória e a capacidade proliferativa de esplenócitos (RUTH *et al.*, 2008).

A atividade antiinflamatória do CLA foi também demonstrada em um modelo de doença inflamatória intestinal, utilizando-se camundongos da linhagem C57BL/6. Doses de 45 a 80 mg/dia de CLA na dieta, durante 7 semanas, promoveu a redução na progressão da doença inflamatória intestinal e conseqüentemente a formação de adenocarcinomas e adenomas nos animais. Assim, através dos resultados obtidos, os autores sugeriram, que o CLA poderia ser considerado como um potencial suplemento alimentar, na prevenção do câncer do colón retal humano (RIERA *et al.*, 2010).

Segundo a revisão de Dhiman *et al* (2005) esta capacidade do CLA na redução do risco de desenvolvimento de câncer, poderia ser estabelecida induzindo uma redução nos mecanismos de proliferação celular, alterando vários componentes do ciclo celular, ou até mesmo induzindo a apoptose de células tumorais, tanto em animais quanto em seres humanos.

Foi ainda demonstrado em um modelo de doença inflamatória celíaca utilizando camundongos transgênicos DQ8, que o isômero c9t11 foi capaz exercer efeitos benéficos com ativação de enzimas citoprotetoras de fase 2, além de modular negativamente a maturação de células dendríticas induzidas por LPS, bem como reduzir os níveis de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12 p70. Assim, concluíram que o c9t11 poderia ser considerado de interesse para seres humanos em condições patológicas associadas a respostas indesejáveis do sistema imune contra alo ou auto-antígenos (BERGAMO *et al.*, 2008).

Do mesmo modo, Park e colaboradores (2007) observaram que os isômeros c9t11 e t10c12 administrados na dieta reduziram os níveis de TNF- $\alpha$ , e sugeriram que os mesmos poderiam exercer efeitos benéficos em diversos modelos de doenças inflamatórias mediadas por TNF- $\alpha$ , a exemplo a artrite reumatóide.

Na sensibilização alérgica de camundongos da linhagem BALB/c com OVA, foi observado que isômero c9t11 reduziu os níveis de IgE, a hiperresponsividade das vias aéreas, a obstrução da mucosa dos brônquios, bem como a produção de IL-5. Logo os autores sugeriram que a dieta rica no isômero *c9t11* poderia ser considerada como uma estratégia atrativa na prevenção e tratamento da asma alérgica (HAMELMANN *et al.*, 2008).

Um estudo utilizando cães da raça Beagle mostrou que o CLA inserido na dieta de cães em estágio de crescimento, reduziu acentuadamente a produção de IgE, mais que de outros isótipos de anticorpos, assim como a produção de TNF- $\alpha$ . Os autores concluíram que o CLA foi importante para esses animais, promovendo um crescimento mais saudável, podendo ser considerado como uma importante alternativa nutricional (RIVERA, 2006).

Em outro trabalho foi observado que o CLA também exerceu efeitos positivos na resposta imune em diferentes períodos de gestação, bem como em animais recém nascidos. Nesse trabalho, Ratas Wistar prenhas foram tratadas com uma dieta rica em um misto de CLA (c9t11/t10c12, 80:20) e seus filhotes avaliados

quanto a resposta imune sistêmica. Foi observado que filhotes de mães tratadas com CLA tiveram um aumento da resposta imune humoral específica à OVA com aumento na produção de anticorpos anti-OVA IgA-, IgG-, e IgM, no soro, baço e linfonodos mesentéricos, além da redução nos níveis de IL-2 (SANTANA *et al.*, 2009).

Sistemicamente também foram observados efeitos do CLA na produção de anticorpos específicos em modelos utilizando seres humanos. Em um modelo de infecção ao vírus de hepatite B, os isômeros *c9t11* e *t10c12* da dieta promoveram um aumento nos níveis de anticorpos contra o vírus, o que se sugere que o CLA poderia ser uma alternativa de interferir beneficemente na resposta imune específica inicial relacionada à vacinação em seres humanos (ALBERS *et al.*, 2003).

Em um modelo utilizando genes de seres humanos, foi observado que o isômero *c9t11* exerceu propriedades antiaterogênicas em células endoteliais da veia umbilical, assim, promovendo uma diminuição da aderência entre macrófagos e células endoteliais, em estímulo por TNF- $\alpha$  (LEE *et al.*, 2009).

Porém além das atividades anticarcinogênicas, outra atividade do CLA é descrita como a antiadipogênica, promovendo crescimento nos seres humanos e reduzindo o risco de várias doenças como a obesidade, a aterosclerose e doenças inflamatórias crônicas (revisados por ROCHE *et al.*, 2001; BELURY, 2002; TANAKA, 2005 e BENJAMIN e SPENER, 2009).

Aos efeitos antiadipogênicos do CLA, tem sido demonstrados em modelos com animais, que o isômero *t10c12* do CLA, foi capaz de reduzir a composição da gordura corporal, aumentando a massa muscular, além de ter uma função como fator de crescimento (PARK *et al.*, 1997; GRIINARI *et al.*, 1998 e BOTELHO, 2005). A essa capacidade do CLA em reduzir depósitos de tecido adiposo, sabe-se que está relacionada diretamente com o aumento do consumo de oxigênio, promovendo a oxidação lipídica, junto à indução de apoptose e /ou diferenciação de adipócitos. (revisado por Belury, 2002).

Como visto em muitos trabalhos, o CLA tem desenvolvido importantes efeitos sobre a resposta imune. No entanto em um trabalho utilizando camundongos Swis-albinos normais e imunossuprimidos por hidrocortisona, foi possível observar que o CLA nas doses de (1mg/kg do peso animal) durante 7 dias, promoveu um aumento na resposta imune dos animais normais, bem como promoveu a restauração da resposta imune nos animais imunossuprimidos; assim sugerindo que o CLA poderia

ser usado como um importante agente imunoterapêutico e imunorestaurador para pacientes imunossuprimidos (BHATIA *et al.*, 2008).

Entretanto apesar de vasto conhecimento das propriedades do CLA no organismo, uma questão que ainda se discute é a qual quantidade de CLA que deve ser consumida na dieta, em especial a humana, a fim de proporcionar os efeitos desejáveis e consequentemente benéficos à saúde. Contudo, é importante considerar que a ingestão média varia consideravelmente entre os indivíduos, devido aos diferentes hábitos alimentares e aos valores de CLA encontrados nos alimentos consumidos (revisado por COLLOMB *et al.*, 2006). Segundo as recomendações do *Food and Nutrition Board of the National Academies (Institute of Medicine – EUA, setembro de 2002)* a ingestão de ácidos graxos essenciais deve ser em torno de 10% do total de lipídios da dieta, sendo que este valor vai de 5 a 10% para os ácidos graxos  $\omega$  6 e de 0,6 a 1-2% para os ácidos graxos  $\omega$  3 (revisado por ANDRADE e CARMO, 2006).

Baseando-se nos resultados de alguns trabalhos aqui mencionados, o que temos hoje são expectativas, de que os efeitos imunomodulatórios do CLA, podem ter aplicações futuras em animais e em seres humanos, como possível alternativa de melhoria na resposta imune, a maneira de conferir resistência a muitas doenças e/ou amenizar os efeitos destas quando estabelecidas.

Desse modo a proposta deste trabalho foi verificar se uma dieta rica no isômero *c9t11* durante 30 dias reduziria os efeitos da hipersensibilidade tipo tardia à OVA, em camundongos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da dieta rica no isômero cis-9 trans-11 do ácido linoléico conjugado (*c9t11*) na modulação da resposta de hipersensibilidade tardia (HTT) à OVA em camundongos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a reação de HTT nas patas dos animais 24 horas após o desafio com OVA;
- Dosar os anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a anti-OVA no soro;
- Determinar os níveis de produção das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-13 no homogenato dos coxins plantares;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 30 camundongos, da linhagem BALB/c, fêmeas, com aproximadamente 4 a 6 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, tendo como forma de alimentação água e ração oferecidas *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas em estantes ventiladas com controle de ar externo (Alesco, EUA), na sala de manutenção de animais do laboratório de Imunologia da UFJF. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF sob o número 07/2010-CEEA, que segue as regras éticas internacionais em experimentação animal.

### 4.2 Preparação das dietas

As manteigas foram obtidas de experimento realizado no Campo Experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco (MG). As manteigas foram produzidas no primeiro dia de cada período de coleta, obtidas do leite de cada tratamento e ordenha (manhã ou tarde). Foram utilizados tratamentos com óleo de soja adicionado na ração das vacas dispostas em um quadrado latino, a 0 % (HTT-MC) e 4,5%(HTT-CLA), 0% (HTT-MC) e 3,0% (HTT-CLA) de inclusão de óleo de soja. A manteiga controle foi obtida do tratamento com 0% de inclusão de óleo de soja e apresentava baixo teor [1,28%] dos ácidos rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) e vacênico (C18:1 *trans*-11), enquanto que aquelas referentes aos tratamentos com 3,0 e 4,5% de inclusão de óleo de soja eram naturalmente enriquecidas com estes ácidos graxos [3,4%]. As manteigas foram produzidas por processo semi-artesanal descrito por Gonzalez e colaboradores (2003).

Durante a fabricação das manteigas, não houve a adição de sal, fermentos lácticos, corantes, descorantes ou coadjuvantes de qualquer tipo.

Estas manteigas foram utilizadas, juntamente com outros componentes mostrados na Tabela 3, para confecção das rações em forma de peletes que serviram como base da dieta dos animais por um período de 30 dias.

Tabela 3. Componentes e suas concentrações na massa total das rações para os grupos manteiga testados.

Componentes	g/kg
Caseína	195,00
DL-Metionina	3,00
Sacarose	341,46
Amido de Milho	150,00
Manteiga *	210,00
Celulose	50,00
Mix-mineral (AIN-93G) (1)	35,00
Mix-vitamínico (AIN-93G) (1)	10,00
Carbonato de Cálcio	4,00
BHT (antioxidante)	0,04

\* Manteigas em concentração ideal (21%) para uma dieta ocidental para roedores.

(1) AIN-93G (Reeves, 1993).

As rações industrializadas destinadas aos grupos controle e HTT eram compostas também por nutrientes em quantidades equilibradas, consideradas ideais a uma dieta típica para camundongos e ratos de laboratório (CR-1), baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – EUA.

Os componentes das rações industrializadas estão mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Composição das rações industrializadas. Nuvilab CR-1 (Nuvital Nutrientes S/A).

Composição do produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos

Níveis de Garantia por Quilograma do Produto	
Umidade (máx)	12,50%
Proteína Bruta (min)	22,00%
Estrato Etéreo (lipídios) (min)	4,50%
Matéria Mineral (máx)	10,00%
Matéria Fibrosa (máx)	8,00%
Cálcio (máx)	1,40%
Fósforo (min)	0,80%

O consumo das dietas foi avaliado em dias alternados, durante 30 dias, observando e pesando as amostras dadas na proporção (g/animal/dia), bem como as amostras das sobras. Para essa avaliação fizemos a diferença entre os valores dados e valores da sobra, assim obtendo o valor consumido em (g/animal/dia), como demonstrado na equação abaixo:

$$VC_{(g/a/d)} = AD_{(g/a/d)} - AS_{(g/a/d)}$$

Equação: VC = valor consumido; AD = amostra dada; AS= amostra da sobra  
(g/a/d) razão: gramas / animal/ dia

As quantidades consumidas das rações para todos os grupos experimentais foram avaliadas durante todos os dias da dieta, com objetivo de obter um valor padronizado visando um aproveitamento melhor e evitar possíveis perdas desnecessárias dos produtos.

### **4.3 Análise do perfil de Ácidos Graxos nas amostras das rações por Cromatografia Gasosa**

As amostras de manteigas foram congeladas e armazenadas (-10°C), visando a posterior determinação do perfil de ácidos graxos no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). A extração da gordura das amostras das manteigas foi realizada como descrito por Hara & Radim (1978), a metilação dos AG de acordo com Christie (1982), e o perfil de AG foi determinado por cromatografia gasosa em cromatógrafo modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., EUA) equipado com coluna CP-SIL 88 FAME 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm (Varian Inc., EUA) e detector de ionização de chama com condições de operação descritas por Cruz-Hernandez e colaboradores (2007), e *software* Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., EUA). Os ácidos graxos (AG) foram identificados, comparando o tempo de retenção dos AG das amostras com os observados em padrões comerciais da Sigma-Aldrich Co. (SUPELCO, Bellefonte, EUA) e de acordo com artigos publicados na literatura (ROACH *et al.*, 2002; DESTAILLATS *et al.*, 2007).

### **4.4 Delineamento Experimental**

#### **4.4.1 Grupos experimentais e tratamentos**

Os camundongos utilizados no presente experimento foram divididos em 4 grupos, sendo que cada grupo foi composto por 7 a 9 animais, tabela 5. No grupo controle os animais não foram imunizados, mas foram desafiados com OVA e receberam como dieta a ração industrializada (Nuvilab, Colina Comércio de Cereais Ltda, Paraná, Brasil). No grupo HTT os animais foram imunizados e desafiados com OVA e receberam como dieta a ração industrializada. Nos grupos HTT-MC e HTT-CLA os animais foram imunizados e desafiados com OVA e receberam como dieta a ração enriquecida com manteiga comum (MC), (contendo baixos teores de c9t11 [1,28%], destinada a controle de dieta lipídica), ou com CLA (contendo alto teor de

c9t11 em 3,4%), respectivamente. A ração foi trocada em dias alternados durante os 30 dias de tratamento e o consumo de ração foi avaliado para todos os grupos.

Tabela 5. Grupos experimentais. Tipo de tratamento e dieta oferecida.

Grupos	N <sup>o</sup> de animais	Imunização*	Desafio**	Dieta
Controle	7	-	+	Ração comum
HTT	7	+	+	Ração comum
HTT-MC	7	+	+	Manteiga comum
HTT-CLA	9	+	+	Manteiga enriquecida com CLA

\*OVA V (1 mg/mL): base da cauda → 100 µL (0,2 mg/animal).

\*\*OVA II (20 mg/mL): coxins → 30 µL (0,6 mg/animal) 8 dias após a imunização.

#### 4.4.2 Indução do modelo de HTT à OVA

Para a indução da reação de HTT os animais foram imunizados com OVA (5 vezes cristalizada grau V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) na concentração de 1 mg/ml adicionada ao CFA (Adjuvante de Freund) na proporção 1:1, após os 30 dias de tratamento dietético. A imunização foi feita na base da cauda com a emulsão resultante da homogeneização das duas suspensões, injetando-se 100 µL de cada lado da base da cauda dos animais (0,2 mg OVA/animal). Após 8 dias fez-se o desafio, utilizando para tal OVA grau II à 20 mg/ml agregada por 1 hora a 80<sup>o</sup>C. Após o tempo de agregação a OVA foi centrifugada a 3000 rpm por durante 10 minutos e o pelete ressuspendido em 1 mL de PBS. O desafio foi realizado injetando-se 30 µL de OVA agregada, que equivale a uma concentração de 0,6 mg de OVA, no coxim plantar da pata traseira esquerda, e para o controle foi injetado 30 µL de PBS no coxim plantar da pata direita. A Figura 6 representa o resumo cronológico da HTT a OVA.

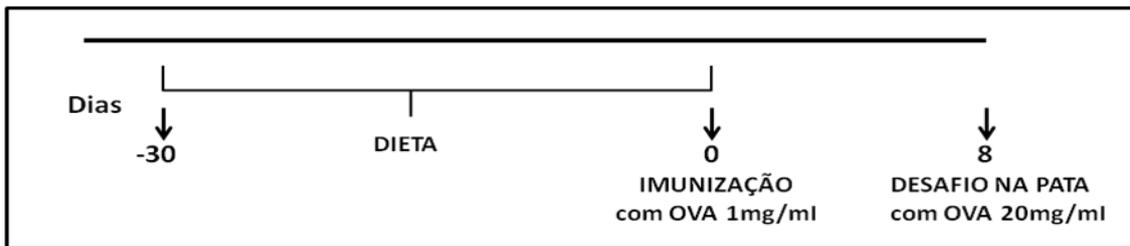


Figura 6. Resumo cronológico do modelo de HTT a OVA.

#### 4.4.3 Medida da espessura das patas

Inicialmente foi realizada a leitura da espessura das patas utilizando um mini paquímetro especial (Starrett n<sup>o</sup> 1010, EUA). A magnitude da resposta de HTT foi determinada pela diferença de espessura entre as patas : direita (OVA) esquerda (PBS) da seguinte forma:

$$\text{Unid HTT (mm)} = [\text{PD com OVA (mm)}] - [\text{PE com PBS (mm)}]$$

#### 4.4.4 Obtenção de material biológico

Todo o material biológico foi obtido 24 horas após o desafio. Foram coletados pelo plexo retro-orbital aproximadamente 0,5 ml de sangue que foi centrifugado a 14000 rpm, por 2 minutos (Centrifuge 5410, Eppendorf, Alemanha) e o soro foi separado e armazenado individualmente a -20°C. Em seguida, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os coxins plantares traseiros foram retirados para preparação de homogenato.

#### 4.4.5 Detecção de anticorpos específicos para OVA no soro

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com OVA (10 µg/mL) diluída em solução tampão bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 18 horas à temperatura de 4°C. As placas foram lavadas 4 vezes com solução PBS+ 0,05% de Tween 20 (PBST) e em seguida bloqueadas com solução de 200 µL de BSA (albumina de soro bovino) 5% em PBS Tween por 2 horas em temperatura ambiente (37°C). Após esse período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST, e as amostras de soro já diluídas para IgG total (1:10), IgG1 (1:2) e IgG2a (1:2), foram acrescentadas e permaneceram incubados por 18 horas à temperatura 4°C. A seguir as placas foram lavadas 4 vezes com PBST e colocou-se 100 µL dos anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a, marcados com peroxidase e a placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente (37°C). Logo após esse tempo a placa foi novamente lavada 4 vezes com PBST e a substância reveladora foi adicionada (10 ml de tampão citrato, 10 mg de OPD e 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com adição de ácido sulfúrico a 30%. A absorbância foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

#### 4.4.6 Dosagem de citocinas no sobrenadante do homogenato do coxim plantar

Para a obtenção do homogenato, foram utilizados 17 mg em média de partes do coxim plantar que foram macerados em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetonio, 10 mM EDTA e 2 µL de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 X g e os sobrenadantes foram imediatamente diluídos e usados para detectar os níveis das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, TGF-β, IL-4 e IL-13, todas na proporção (1:2) por ELISA. Foram utilizados os kits de ELISA (BD Biosciences, EUA) para quantificar as citocinas TNF-α; IFN-γ, IL-10, TGF-β, IL-4 e IL-13, de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, para a dosagem de citocinas, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBS-Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados, permanecendo

incubando por 1 hora, seguida por lavagem. Para determinação das citocinas, as curvas-padrão para as respectivas citocinas e as amostras do sobrenadante dos coxins plantares foram adicionadas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação foi revelada pela adição do substrato. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura foi feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA) a 450 nm. As concentrações de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas recombinantes.

#### 4.4.7 Análises estatísticas

Os dados numéricos foram analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, foi utilizado o teste Mann-Whitney para dados não-paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de  $p < 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise de ácidos graxos das amostras destinadas as dietas

As concentrações dos ácidos graxos foram avaliadas com as amostras de peletes e manteigas para os grupos HTT-MC (peletes MC e manteiga MC) e HTT-CLA (peletes CLA e manteiga CLA).

Na análise foi observado que o principal precursor do c9t11, o ácido trans vacênico (TVA), e o próprio isômero c9t11, encontraram-se em maiores concentrações para o grupo HTT-CLA, tanto nas amostras de peletes e manteigas; quando comparados ao grupo HTT-MC. Com relação às concentrações do isômero t10c12, esta foi encontrada em baixas concentrações em ambas as amostras e ambos os grupos avaliados (HTT-MC e HTT-CLA) (Tabela 6).

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos nas amostras de peletes e manteigas.

Ácido graxo (g/100 g de AG totais)	Pelete MC	Manteiga MC	Pelete CLA	Manteiga CLA
C18:1 trans-11 (TVA)	2,37	1,70	6,64	6,92
C18:2 cis-9 cis-12	2,03	2,34	2,47	2,34
C18:3 cis-9 cis-12 cis-15	0,22	0,23	0,22	0,21
CLA cis-9 trans-11	1,23	1,12	3,12	3,39
CLA trans-10 cis-12	0,02	0,02	0,05	0,05

Precusores: (TVA) Trans Vacênico (amarelo); Ácido Linoléico (azul); Ácido  $\alpha$ -Linolênico (cinza). Isômeros: CLA c9t11 (vermelho), CLA t10c12 (verde). MC ("pelete" e manteiga comum) para o grupo HTT-MC; CLA ("Pelete" e manteiga rica em CLA) para o grupo HTT-CLA.

## 5.2 Peso dos animais e consumo de dieta

O peso dos animais foi avaliado semanalmente e não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em cada uma das semanas de tratamento, assim como não foram observadas diferenças para cada um dos grupos comparando-se todas as 4 semanas de tratamento (Figura 7 A).

Em relação ao consumo das dietas os animais do grupo controle e grupo HTT ao receberem dieta com uma quantidade aproximada de 115 g/dia de ração industrializada consumiram respectivamente um valor em média de 4,15 g/dia/animal e 4,12 g/dia/animal, já os grupos de dieta lipídica HTT-MC (baixo teor de c9t11) e HTT-CLA (alto teor de c9t11) em 65 g/dia de ração com manteiga, consumiram respectivamente em média 3,13 g/dia/animal e 3,31 g/dia/animal (Figura 8 B). Portanto os grupos submetidos a dieta lipídica (HTT-MC e HTT-CLA) induziu um consumo menor do que nos grupos submetidos a dieta comum (controle e HTT) (Figura 7B).

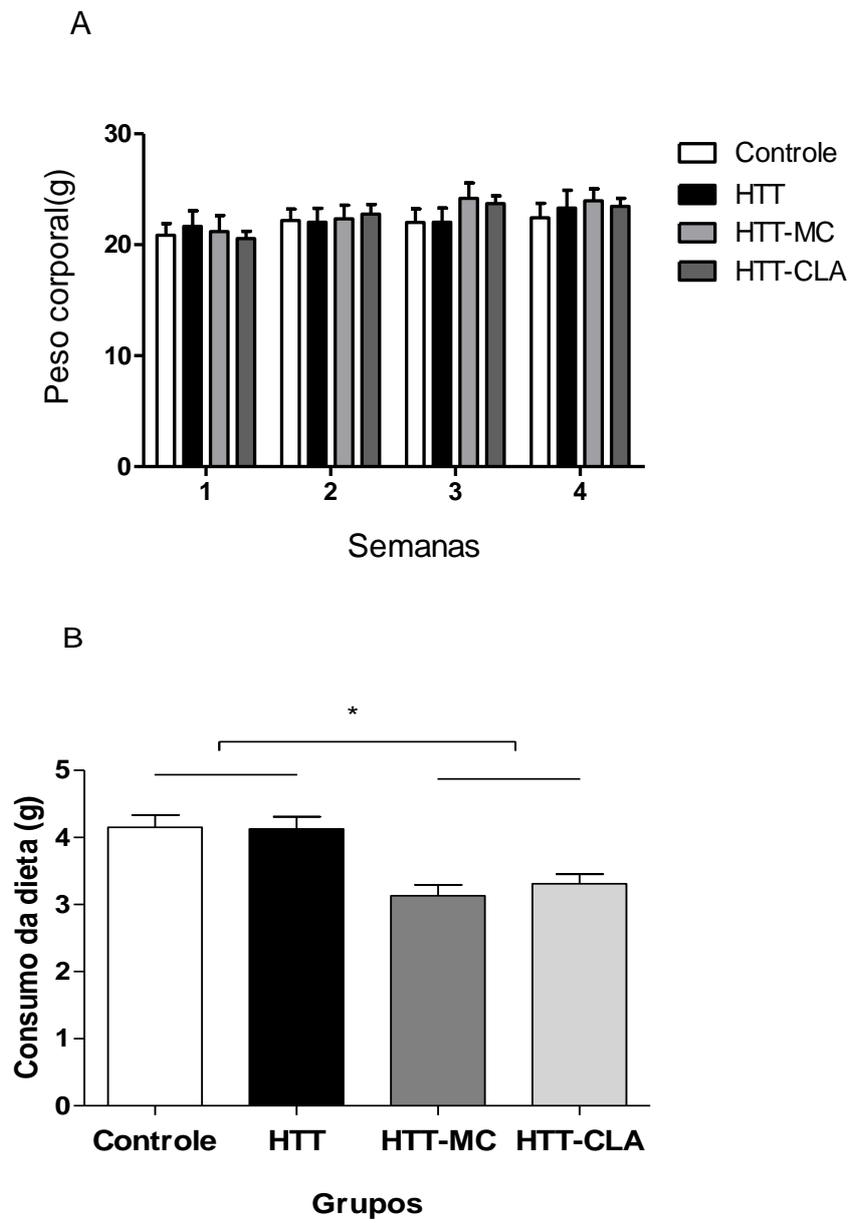


Figura 7. Peso dos camundongos durante as 4 semanas de dieta (A). Consumo das dietas pelos grupos experimentais em 30 dias (B), \*  $P < 0,05$  quando compara-se (Controle/ HTT com HTT-MC/ HTT-CLA).

### 5.3 Efeito do CLA na HTT à OVA

Após o desafio com a OVA no coxim plantar o aumento da espessura das patas foi avaliado, sendo que foi observado que no grupo HTT houve um aumento significativo quando comparado ao grupo controle. O tratamento com manteigas em baixo (HTT-MC) e alto teor de c9t11 (HTT-CLA) reduziram significativamente o HTT, sendo esta resposta mais acentuada no grupo HTT-CLA (Figura 8).

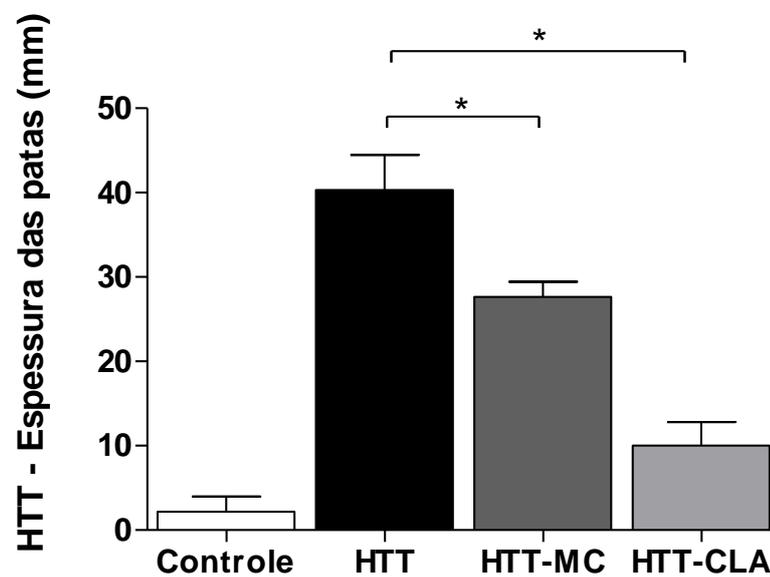


Figura 8. Reação da Hipersensibilidade tipo Tardia (HTT) a OVA. A espessura do coxim plantar dos camundongos foi medida 24 horas após o desafio com OVA. \*  $P < 0,05$  quando compara-se HTT-MC com HTT e \*\*  $P < 0,001$  quando compara-se HTT-CLA com HTT.

#### **5.4 Ação do CLA sobre os níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2a específica para OVA**

Os níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-OVA foram avaliados após 8 dias de imunização com OVA (Figura 9). Houve aumento nos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a quando compara-se o grupo HTT com o grupo controle. Com a relação a IgG total, o grupo HTT-MC (baixo teor de c9t11) apresentou maior nível de anticorpos quando comparado ao grupo HTT, entretanto no grupo HTT-CLA (alto nível de c9t11) este continuou semelhante ao do grupo HTT. Os níveis de IgG1 foram maiores para os grupos HTT-MC e HTT-CLA com relação ao grupo HTT. Já os níveis de IgG2a foram menores para os grupos HTT-MC e HTT-CLA quando comparados ao grupo HTT. Vale ressaltar que tanto o aumento de IgG1, quanto o decréscimo de IgG2a para o grupo HTT-CLA foi um pouco mais significativo que o grupo HTT-MC, em relação ao grupo HTT ( $P < 0,05$  X  $P < 0,001$ ).

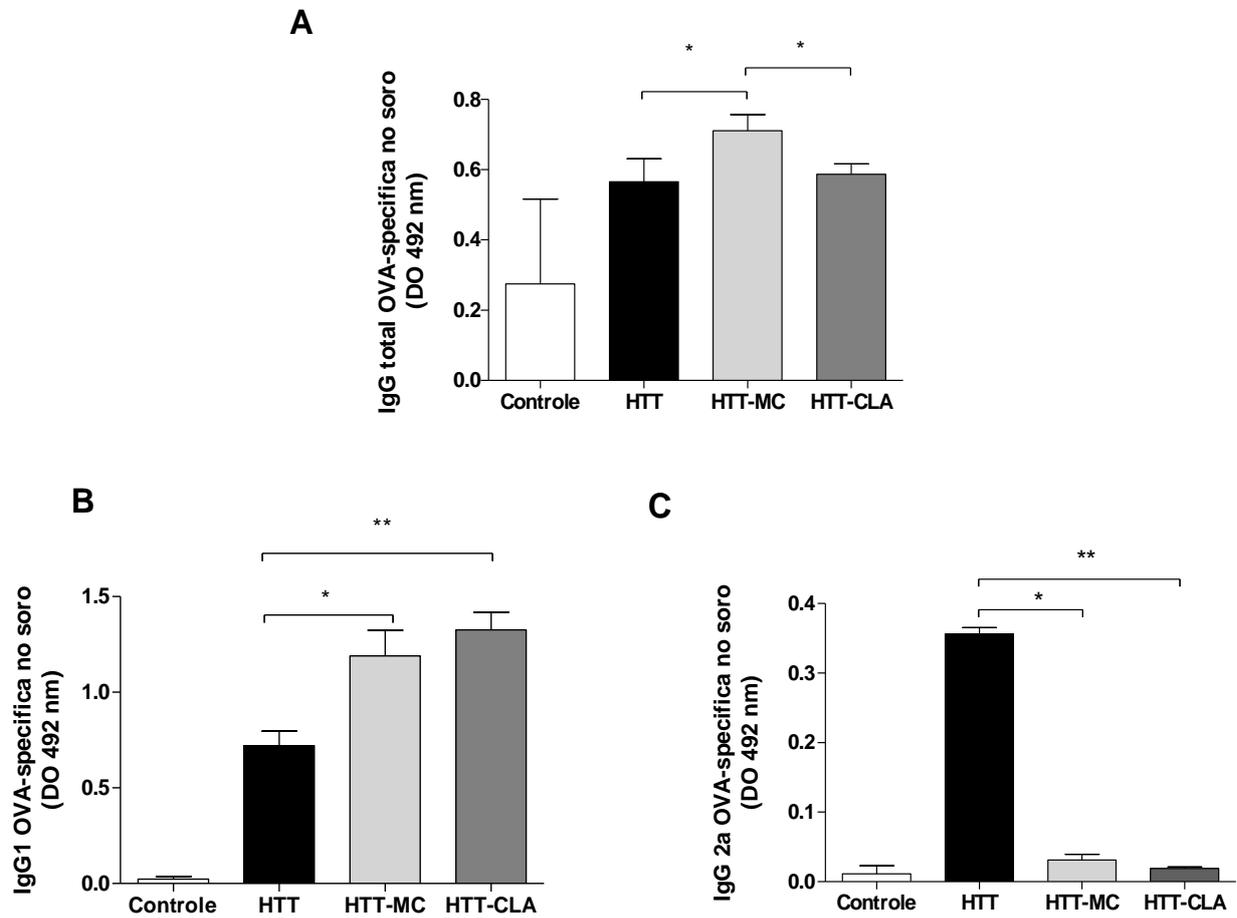


Fig 9. Níveis séricos de IgG Total (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). O soro dos animais foram avaliados após 8 dias da imunização.\*  $P < 0,05$  quando compra-se ao grupo HTT. \*\*  $P < 0,001$  quando compara-se ao grupo HTT.

### **5.5 Efeito do CLA nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-13)**

Quanto aos níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato dos coxins plantares, foi observada redução significativa na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos grupos HTT-MC (baixo teor de c9t11) e HTT-CLA (alto teor de c9t11), com a indução do modelo de hipersensibilidade tipo tardia quando comparados ao grupo HTT (Figuras 10 A e 10B). Os níveis de produção de IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante do coxim plantar foram maiores no grupo suplementados com baixo teor do c9t11, quando comparado aos demais grupos (Figuras 10C e 10D).

Nos animais do grupo HTT observou-se níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), quando comparado ao grupo controle, enquanto os níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  mantiveram-se inalterados em relação ao grupo controle.

Com relação aos níveis de IL-4 e IL-13 não foi detectado valores significativos para nenhum dos grupos testados.

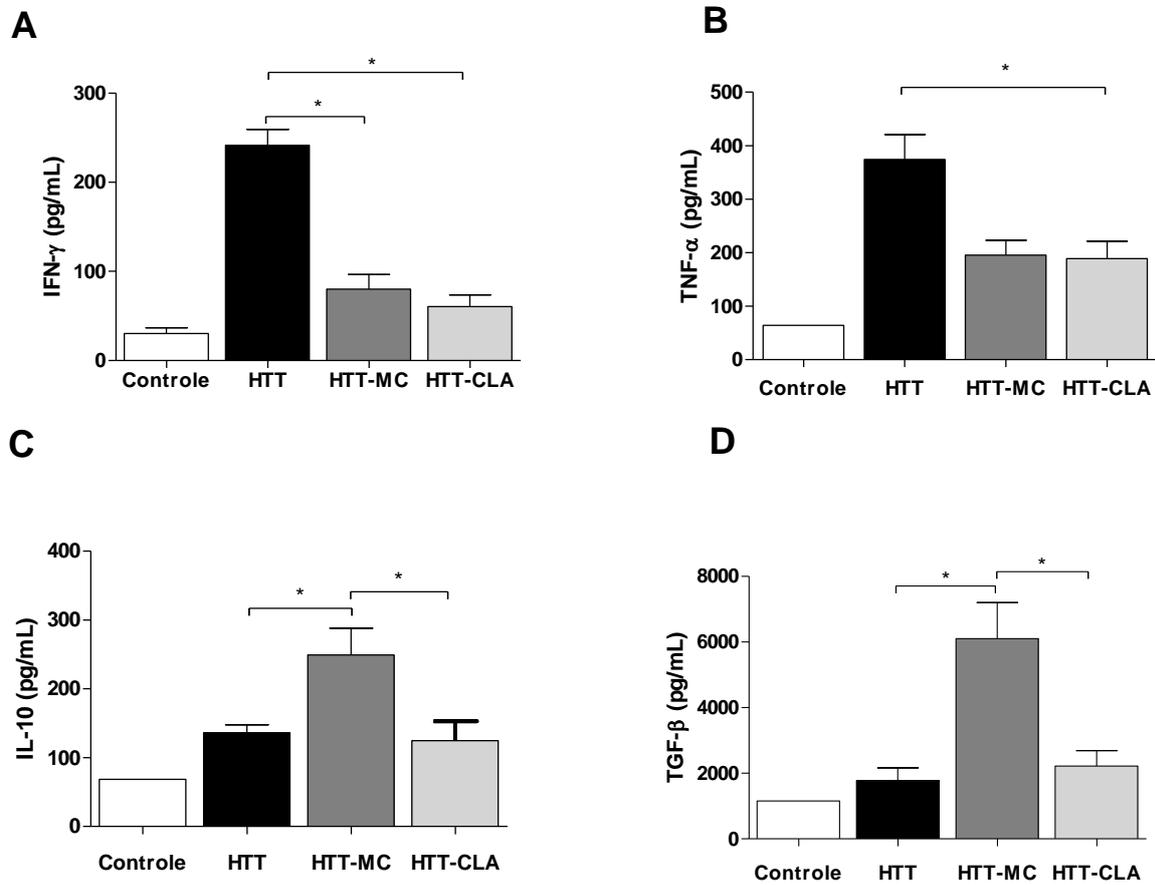


Fig 10. Níveis de citocinas como (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-10, (C) TGF- $\beta$  e (D) IFN- $\gamma$ , avaliados por ELISA após 8 dias de imunização com OVA. \*  $P < 0,05$  quando compara-se HTT com HTT-MC e HTT com HTT-CLA.

## 6 DISCUSSÃO

Diversos trabalhos tem demonstrado que o CLA, em especial os isômeros *c9t11* e *t10c12* apresentam diferentes atividades biológicas, promovendo benefícios a saúde em geral. Além disso os isômeros *c9t11* e *t10c12* podem atuar de formas diferentes ou sinérgicas em todo organismo (revisado por AYDIN, 2005), principalmente sobre a resposta imune, atuando em diferentes subtipos de linfócitos T e isotipos de imunoglobulinas, sendo que estes efeitos foram realizados tanto em estudos envolvendo modelos animais como em seres humanos (revisado por O'SHEA *et al.*, 2004).

Vários mecanismos são propostos com base na modulação dos efeitos do CLA sobre a resposta imune, podendo ser resumidos em três efeitos moleculares: alteração na composição e função das membranas celulares, na produção de eicosanóides e na produção de citocinas (revisados por YAQOOB e CALDER, 2007; FRITCHE, 2006; KELLEY, 2005 e O'SHEA *et al.*, 2004). A compreensão desses mecanismos pode servir como importante base para o desenvolvimento de alimentos nutricionalmente adequados, com base em aplicações terapêuticas para aumentar a resistência do hospedeiro contra doenças infecciosas e para tratar desequilíbrios imunológicos, que resultam em distúrbios inflamatórios e/ou reações alérgicas.

Assim, no presente trabalho utilizou-se como base experimental o isômero *c9t11* adicionado na dieta durante 30 dias, objetivando avaliar se este ácido graxo na dieta influenciaria no desenvolvimento e crescimento dos animais, bem como no desenvolvimento da resposta imune envolvida na reação de HTT à OVA.

Primeiramente, foi avaliado se o *c9t11* influenciaria no peso corporal dos animais. Ao longo dos 30 dias de dieta, observou-se que os animais submetidos à dieta lipídica (HTT-MC e HTT-CLA) consumiram menos quantidade da dieta quando comparados aos demais grupos (Controle e HTT). Isto poderia ser explicado pelo fato que as duas dietas possuíam diferentes níveis lipídicos (MC e CLA = 21,0 % / Nuvilab CR-1 = 4,5%) o que provavelmente levou aos animais a diferentes níveis de saciedade, visando a obtenção de níveis desejáveis de energia às atividades diárias.

Em muitos trabalhos o que se tem observado é que o isômero *c9t11* apresenta importante papel na modulação da resposta imune, principalmente, intervindo em respostas inflamatórias (revisados por O'SHEA *et al.*, 2004; KELLEY, 2005; PARK *et al.*, 2007 e REYNOLDS & ROCHE, 2010). Em face desses conhecimentos, no presente trabalho, após os 30 dias de dieta, foi induzido o modelo de HTT anti-OVA nos animais. As reações de HTT são respostas do sistema imune, induzidas por linfócitos T, com produção de citocinas pró-inflamatórias, que levam a uma resposta inflamatória. Esta reação é intensificada através de sucessivas interações com determinado antígeno (revisado de KOBAYASHI *et al.*, 2001; ISHIGAME *et al.*, 2006; KIM e MOUDGIL, 2008; ZHANG, 2009).

O CLA tem de mostrado agir diferentemente sobre as respostas de HTT, o que torna mais abrangente seu estudo frente a diferentes modelos experimentais da resposta imune.

Foi demonstrado que uma dieta rica em ácido linoléico dada por (1,5g/dia) durante 50 dias, para homens saudáveis, não alterou nenhum dos aspectos imunológicos testados como atividade de células NK, a proliferação de clones de linfócitos T e B, a secreção "*in vitro*" de IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$ , assim como as reações de HTT (KELLEY *et al.*, 1997 *apud* KELLEY, 2001). Além disso, foi demonstrado que a dieta rica nos dois isômeros *c9t11* e *t10c12* na proporção (50:50) 3g/dia por 12 semanas em humanos de idades entre 25 e 50 anos, foi capaz de reduzir fortemente as respostas de HTT, além dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (WAHLE *et al.*, 2005). Entretanto outro trabalho demonstrou que o CLA (*c9t11/t10c12*) em dose de 1mg/kg do animal durante 7 dias, foi capaz de aumentar a intensidade das respostas de HTT, tanto em camundongos normais quanto em animais imunossuprimidos por hidrocortizona, sendo que foi sugerido que o CLA poderia ser considerado como um importante agente para a restauração da resposta imune a pacientes imunossuprimidos (BHATIA *et al.*, 2008).

No presente estudo, tanto os animais suplementados com a dieta apresentando alto teor de *c9t11* (HTT-CLA), como os animais suplementados com baixo teor de *c9t11* (HTT-MC) tiveram a espessura das patas reduzidas quando comparados ao grupo HTT, sendo que essa diminuição mostrou-se maior no grupo HTT-CLA. Em relação a esse resultado, sugere-se que o isômero *c9t11* pode ter atuado sobre a síntese de diversas moléculas envolvidas no processo inflamatório da HTT; levando a uma redução do fluxo celular e conseqüentemente a diminuição

da espessura das patas dos animais. Entretanto para melhor conclusão desse resultado faz-se necessário um estudo que avalie principalmente os níveis de quimiocinas e citocinas envolvidas nesse processo, bem como uma análise histopatológica dos coxins plantares dos animais.

A partir do homogenato dos coxins plantares dos animais submetidos à reação de HTT, observou-se que nos animais tratados com alto teor de c9t11 (HTT-CLA), os níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  encontraram-se reduzidos de forma mais expressiva, quando comparados ao grupo HTT. Outros autores já haviam demonstrado a ação específica do CLA sobre citocinas pró-inflamatórias (RUTH *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2002). Em relação às citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$ , os níveis foram muito maiores nos animais suplementados com a dieta com baixo teor de c9t11 (HTT-MC), quando comparado aos animais suplementados com alto teor de c9t11 (HTT-CLA) e HTT. O que pode-se sugerir é que o c9t11 em baixa concentração, como mostrado para dieta do grupo HTT-MC [1,28%] poderia ter mediado uma resposta regulatória sobre a reação de HTT, induzindo a ativação de clones de linfócitos T regulatórios. Já em quantidades maiores de c9t11 (HTT-CLA) [3,4%], onde as citocinas inflamatórias avaliadas estavam diminuídas e não houve produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , os níveis de CLA pode ter influenciado em todos os subtipos de linfócitos T envolvidos na reação de HTT. Entretanto para um melhor entendimento deste mecanismo seria de suma importância avaliar quais os subtipos celulares envolvidos.

Segundo as revisões de Mossmann e Coffman (1996) e O'shea e colaboradores (2004), linfócitos T helper 1 (Th<sub>1</sub>) tem o papel de aumentar as respostas inflamatórias, assim conduzindo linfócitos B à mudança de classe de anticorpos, produzindo o isótipo de imunoglobulina IgG2a. Em contrapartida, linfócitos T helper 2 (Th<sub>2</sub>) conduziriam a produção de imunoglobulinas dos isótipos IgG1 e IgE, promovendo vias de natureza antiinflamatórias. Assim nesse trabalho com o objetivo de avaliar em qual dos perfis de linfócitos Th<sub>0</sub> o isômero c9t11 estaria envolvido, dosagens de anticorpos IgG total, e dos isótipos IgG1 e IgG2a foram estabelecidas. Os resultados indicaram que a dieta com c9t11 nas duas concentrações tiveram um papel similar com relação à diferenciação dos clones Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>, onde a dieta com alta concentração de c9t11 (HTT-CLA) aumentou os níveis do isotipo IgG1, diminuindo os níveis do isotipo IgG2a, de uma maneira mais intensa que a dieta contendo baixos níveis de c9t11(HTT-MC). Entretanto a dieta com baixo

nível de c9t11 (HTT-MC) foi capaz de aumentar os níveis de IgG total no soro dos animais. Esses resultados sugerem que a presença do CLA nas dietas diminui o perfil Th<sub>1</sub> e aumenta o perfil Th<sub>2</sub>, assim corroborando com os resultados que mostram a redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A esse fato talvez pode-se atribuir que o c9t11 foi capaz de reduzir o perfil Th<sub>1</sub> envolvido no modelo, pelo fato de ser um derivado do ácido linoléico, um ácido graxo da família  $\omega$ 6, que tem propriedades de estimular preferencialmente a proliferação de linfócitos Th<sub>2</sub> (VLIES *et al.*, 2011).

Ainda com relação à atividade regulatória do c9t11 em baixas concentrações (HTT-MC), pode-se sugerir que este tenha induzido vias de sinalização para a ativação de um subtipo de linfócito T, conhecido como linfócito T regulatório (Tregs). As Tregs são subpopulações de linfócitos T com marcadores CD4+CD25+ que expressam altos níveis de fator de transcrição Foxp3. Elas podem agir independentes de contato e de forma antígeno-específica *in vitro* e *in vivo*, secretando citocinas antiinflamatórias como IL-10 e/ou TGF- $\beta$ , assim, regulando as respostas imunes e patologias inflamatórias. Estas células são caracterizadas também pela habilidade de suprimir as células T efetoras de qualquer fenótipo Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>. (revisado por HAWRYLOWICZ e O'GARRA, 2005; KESSEL *et al.*, 2007). Portanto a utilização de um ensaio com marcadores específicos para células Tregs seria interessante, para uma melhor elucidação desse tópico.

Além das células T regulatórias, sabe-se que linfócitos B também apresentam propriedades imunomodulatórias, e esses são conhecidos como linfócitos B regulatórios (Bregs). Essas células são capazes de produzir citocinas regulatórias como IL-10 ou TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, enquanto as células B efetoras produzem IL-2, IL-4, TNF, IL-6 (células B2) ou IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF (células B1) aumentando respectivamente as respostas Th<sub>2</sub> e Th<sub>1</sub> (revisado por LUND, 2008). É conhecido também que as células B regulatórias expressam TLRs tendo habilidade de responder rapidamente a produtos derivados de patógenos, modulando assim as respostas inflamatórias. Sabe-se que a IL-10 produzida por células B regulatórias (B1a) neonatal bloqueia a produção de IL-12 pelas células dendríticas TLR9-ativadas, resultando na redução da resposta Th<sub>1</sub> e predominância da resposta Th<sub>2</sub> (LO-MAN *et al.*, 2005). Portanto pode-se sugerir que os níveis aumentados de IgG total observados no grupo HTT-

MC poderiam ser resultantes da indução de linfócitos B regulatórios, levando a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ .

Desse modo pode-se concluir baseado nos resultados apresentados, que dependendo das concentrações do isômero c9t11, podem-se ter diferentes efeitos sobre a resposta imune. Estas diferenças poderiam estar relacionadas às diversas subpopulações de células, citocinas, quimiocinas, entre outras moléculas do sistema imune. Portanto para melhor elucidação destes efeitos, mais estudos deverão ser realizados, visando uma melhor alternativa para a prevenção de determinadas patologias, principalmente aquelas de caráter inflamatório.

## 7 CONCLUSÃO

- O isômero c9t11 reduziu os efeitos das reações de HTT a OVA em suas diferentes concentrações, porém mais fortemente quando em alta concentração;
- Nos coxins plantares dos animais submetidos a reação de HTT, o isômero c9t11 agiu suprimindo fortemente as o perfil de citocinas pró-inflamatórias IFN-  $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ;
- No soro dos animais submetidos à reação de HTT, o isômero c9t11 induziu um perfil Th<sub>2</sub>, apresentando altos níveis de IgG1 e reduzindo consequentemente os níveis de IgG2a;
- Em baixas concentrações o c9t11 aumentou os níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ , sugerindo possível atividade regulatória da resposta imune localizada.

## REFERÊNCIAS

ALBERS, R.; WIELEN, V. RPJ.; BRINK, EJ.; HENDRIKS, HFJ.; TARAN, D. VN.; MOHEDE, ICM. 2003. Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. **European Journal of Clinical Nutrition**, **57**: 595-603.

ANDRADE, M. M. P.; CARMO, T. G. M. 2006. N-3 fatty acids: a link between eicosanoids, inflammation and immunity. *Instituto de Nutrição Josué de Castro, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, mn-metabólica*, **8 (3)**.

ANDRADE, L. C. **O estudo da ação imunobiológica de um novo derivado 6-mercaptapurínico**: GTPII. 1997. UNIFESP, São Paulo, 1997.

AYDIN, R. 2005. Conjugated Linoleic Acid: Chemical Structure, Sources and Biological Properties. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, **29**: 189-195.

BAUMAN, D. E.; GRINARI, J. M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, **23**: 203–27.

BAUMAN, D.E.; BARBANO, D.M.; DWYER, D.A.; GRINARI, J.M. 2000. Technical Note: Production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models. **Journal of Dairy Science**, **83**: 2422–2425.

BELTON, O.; McCLELLAND, S.; COX, C; O'CONNOR, R.; GAETANO de, M.; Mc CARTHY, C.; CRYAN, L.; FITZGERALD, D. 2010. Conjugated linoleic acid suppresses the migratory and inflammatory phenotype of the monocyte/macrophage cell. **Atherosclerosis**, **211**: 96-102.

BELURY, M. A. 2002. Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health: Physiological Effects and Mechanisms of Action. **Annual Review of Nutrition, Palo Alto, 22:** 505-531.

BENJAMIN. S.; SPENER, F. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism, 6:** 36. doi:10.1186 / 1743-7075-6-36.

BERGAMO, P.; MAURANO, F.; D`ARIENZO, R.; DAVID, C.; ROSSI, M. 2008. Association between activation of phase 2 enzymes and down-regulation of dendritic cell maturation by c9, t11-conjugated linoleic acid. **Immunology Letters, 117:** 181–190.

BERGAMO, P.; LUONGO, D.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; STEFANILE, R.; ROSSI, M. 2006. Conjugated linoleic acid enhances glutathione synthesis and attenuates pathological signs in MRL/MpJ-Fas lpr mice. **Journal of Lipid Research, 47:** 2382-2391.

BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J. M. R. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science, 63:** 201-211.

BETINI, M.; VIGNALI, D. A. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. 2009. **Current Opinion in Immunology, 21 (6):** 612-618.

BHATIA, A.; KUMAR, R.; PAWAN, R. 2008. Immunorestorative potential of conjugated linoleic acid: An “*in vivo*” study. **Journal Immunology, 1:** 10-15.

BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry, 17:** 789-810.

BOTELHO, A. P.; SANTOS-ZAGO, L. F.; REIS, S. M. P. M. 2005. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduzindo a gordura corpora em ratos *Wistar*. **Revista de Nutrição, 18 (4):** 561-565.

BRANDÃO, A. P.; COSTA, P. G. F.; BARROS, R. L.; NASCIMENTO, J. A. G. 2005. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica, 26 (1):** 5-14.

BREHM, M. A.; SHULTZ, L. D.; GREINER, D. L. 2010. **Humanized mouse models to study human diseases.** *Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 17 (2): **120-125.**

BROW, D.W.; MOORE, W.E.C.1960. Distribution of *Butyrivibrio fibrisolvens* in nature. **Journal of Dairy Science, 43:** 1570-1574.

CALDER, P.C. 2003. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. **Lipids, 38:** 343-52.

CALDER, P. C. 2010. Marine omega-3 fatty acids and inflammation. **Journal Lipid Nutrition, 19 (2):** 12.

CHEN, L.; LIN, S.; OVERBEGH, L.; CHAN, L. 2005. The disease progression in the keratin 14 IL-4-transgenic mouse model of atopic dermatitis parallels the up-regulation of B cell activation molecules, proliferation and surface and serum IgE. **Clinical & Experimental Immunology, 142 (1):** 21-30.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHA. E-L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal, Barking, 16:** 1347-1361.

COOK, M. E.; PARIZA, M. 1998. The role of conjugated linoleic acid (CLA) in health. **International Dairy Journal, Winsconsin, 8:** 459-462.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A.; GRINARI, J. M.; PHILIPS, B. S.; BAUMAN, D. E. 2001. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **Journal of Nutrition, 38:** 225 - 232.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V. C. T. 1999. **Diseases of Immunity. Robbins pathologic basis of disease.** Philadelphia: Saunders: 188 - 259.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. 1982. **Journal Lipid Resarch, 23:** 1072 - 1082.

CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K.G.; KENNELLY, J.J.; GLIMM, R. D.; SORENSEN, M. B.; OKINE, K. E.; GOONEWARDENE, A.L.; WESELAKE, J. R. 2007. Evaluating the conjugated linoleic acid trans 18:1 isomers in milk fat dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science, 90:** 3786 - 3801.

DESTAILLATS, F.; GOLAY, P.A.; JOFFRE, F.; WISPELAERE, M.; HUG, B.; GIUFFRIDA, F.; FAUCCONNOT, L.; DIONISI, F. 2007. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. **Journal of Chromatography, 1145:** 222-228.

DHIMAN, T. R.; NAM, S.; URE, A. L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45:** 463-482.

DHIMAN, T.R.; ANAND, G. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W. 1999. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, **82**: 2146–2156.

FA, M.; DIANA, A.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MELIS, M. P.; MURRU, E.; SOGOS, V.; BANNI, S. 2005. Incorporation and metabolismo f c9t11 and t10c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1736**: 61-66.

FIELD, J. C.; PROCTOR, J. S.; RUTH, R. M.; GERDUNG, A. C.; BLEWETT, J. H. 2009. Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR: LA-cp rats. **British Journal of Nutrition**, **102**: 526–536.

FRITSCHKE, K. 2006. Fatty acids as modulators of the immune response. **Annual Review of Nutrition**, **26**: 45–73.

FUNCK, L. G.; BARRERA-ARELLANO, D.; BLOCK, J. M. 2006. Ácido linoléico conjugado (CLA) e sua relação com a doença cardiovascular e os fatores de risco associados. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, **56 (2)**: 1-15.

GALLI, C.; CALDER. 2009. Effects of Fat and Fatty Acid Intake on Inflammatory and Immune Responses: A Critical Review. **Annual Nutrition Metabolism**, **55**:123–139.

GALLI, S.; LANTZ, C. S. 1999. **Allergy. In:** Paul WE, editor. Fundamental immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1127–1174.

GONZALEZ, S.; DUNCAN, S. E.; O'KEEFE, S.F.; SUMNER, S.S.; HERBEIN, J.H. 2003. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**, **86**: 70–77.

GRIINARI, J. M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta (9)-desaturase. **The Journal of Nutrition, Bethesda, MD ,130 (9):** 2285-2291.

HAMELMANN, E.; JAUDSZUZ, A.; KROKOWSKI, M.; MOCKEL.; DARCAN, Y.; AVAGYAN, A.; MATRICARD, P.; JAHEIS, G. 2008. Cis-9,trans-11-Conjugated Linoleic Acid Inhibits Allergic Sensitization and Airway Inflammation via a PPAR $\gamma$  - Related Mechanism in Mice. **The Journal of Nutrition. Nutritional Immunology, 138:** 1336–1342.

HARA, A.; RADIN, N.S. 1978. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry, 90:** 420-426.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O’GARRA, A. 2005. Potential role of interleukin-10 secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology, 5 (4):** 271-283.

HOFFMAN, H. M. Terapy of autoinflammatory syndromes. 2009. **Journal Allergy Clinical in Immunology, 124 (6):** 1129-1138.

IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H. J.; SCIMECA, J. A. 1994. Conjugated Linoleic Acid Suppresses Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity of the Mammary Gland in the Rat. **Cancer Research, 54:** 1212-1215.

ISHIGAME, H.; NAKAJIMA, A.; SAIJO, S.; KOMIYAMA, Y.; NAMBU, A.; MATSUKI, T.; NAKAE, S.; HORAI, R.; KAKUTA, S.; IWAKURA, Y. 2008. The role of TNF-alpha and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory disease in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. **Ernst Schering Res Found Workshop, 56:** 129-53.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptative immunity by the innate immune system. 2010. **Science**, **327 (5963)**: 291-295.

JOHANSSON, S.; LONNQVIST, A.; OSTMAN, S.; SANDBERG, S. A.; WOLD, E. A. 2011. Long-chain polyunsaturated fatty acids are consumed during allergic inflammation and affect T helper type 1 (Th1)- and Th2-mediated hypersensitivity differently. **Clinical and Experimental Immunology**, **160**: 411–419.

JOO, T. S.; PARK, B. G.; HUR, J. S. 2007. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, **110**: 221–229.

KALISH, S. R.; ASKENASE, W. P. 1999. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and autoimmunity. **J Allergy Clinical Immunology**, **103 (2)**: part 1.

KELLEY, D. S.; TAYLOR, P. C.; NELSON, G. J.; MACKEY, B. E. 1997. Effect of dietary arachidonic acid on human immune response. **Lipids**, **32**: 449.

KELLEY, S. D. 2001. Modulation of Human Immune and Inflammatory Responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**, **17**: 669–673.

KELLEY, D.S.; HUBBARD, N.E.; ERICKSON, K.L. 2005. Regulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. Department of Cell Biology and Human Anatomy, School of Medicine University of California Davis, California 95616. **Advances in food and nutrition research**, **50**: 1-38.

KELLY, M. L.; BAUMAN, D. E. 1999. There's a potent cancer-fighting agent in milk. **Hoard's Dairyman**, **144 (10)**: 416.

KENNELLY, J. J.; BELL, J. A. 2007. Conjugated Linoleic Acid: Incorporation into bovine milk fat and effects on human health. **Feed Energy Company**. Disponível em: <[http://www.feedenergy.com/Conjugated\\_Linoleic\\_Acid.pdf](http://www.feedenergy.com/Conjugated_Linoleic_Acid.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2010.

KESSEL, A.; AMMURI, HANA.; PERI, R.; PAVLOTZKY, R. E.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y.; TOUBI, E. 2007. Intravenous Immunoglobulin Therapy Affects T Regulatory Cells by Increasing Their Suppressive Function. **Journal Immunology**, **179**: 5571 - 5575.

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. 2008. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. **Immunology Letters**, **120**: 1 - 5.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. 2001. Immunopathogenesis of Delayed Type Hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, **53**: 241 - 245.

KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; JAHREIS, G.; DUGAN, ER. M. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **79**: 1137 - 1145.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; CZARNECKI, S.K.; WILSON, T. A.; NICOLOSI, R.J. 2004. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and regression of lesions. **Lipids**, **39**: 611 - 616.

LAWSON, R. E.; MOSS, A. R.; GIVENS, D. I. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. **Nutrition Research Reviews**, **14**: 153 - 172.

LEE, Y.; THOMPSON, T. J.; LERA, R. A.; HEUVEL, V. P. J. 2009. Isomer specific effects of conjugated linoleic acid on gene expression in RAW 264.7. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **20**: 848 - 859.

LEE, J. H.; CHO, K. H.; LEE, K. T.; KIM, M. R. 2005. Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **53**: 7295 - 301.

LO-MAN, R.; SUN, C-M.; DERIAUD, E.; LECLERC, C. 2005. Upon TLR9 Signaling, CD5+ B Cells Control the IL-12-Dependent Th1-Priming Capacity of Neonatal DCs. **Immunity**, **22**: 467 - 477.

LUND, F.E., 2008. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. **Current Opinion in Immunology**, **20**: 332 - 338.

MARTIN, A. C.; ALMEIDA de, V. V.; RUIZ, R. M.; VISENTAINER, L. E. J.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA de, E. N.; VISENTAINER, V. J. 2006. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista de Nutrição**, **19 (6)**: 761 - 770.

MARTINS, M.J. ; GRUEZO, D. N. 2009. Ácido Graxo w-6 na Etiologia do Câncer de Cólon e Reto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **55 (1)**: 69-74.

MEAD, C. J; MERTIN, J. 1978. Fatty acids and immunity. **Advances in Lipid Research**, **16**: 127–65.

MOLONEY, F.; TOOMEY, S.; NOONE, E.; NUGENT, A.; ALLAN, B.; LOSCHER, E. C.; ROCHE, M. H. 2007. Antidiabetic Effects of *cis*-9, *trans*-11–Conjugated Linoleic Acid May Be Mediated via Anti-Inflammatory Effects in White Adipose Tissue. **Diabetes**, **56**: 574–582.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Advances in Immunology**, **46**: 111-47.

NELSON, L. D.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger. Fundamentos da Bioquímica, Lipídios**. 5<sup>a</sup> ed . Porto Alegre: Artmed, 2011.1304p.

O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. CM. 2004. The role of conjugated linoleic acid in human health. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, **79 (6)**: 1199-1206.

OLIVEIRA, de G. R. 2010. **Estudo da ação imunobiológica do laser de baixa intensidade sobre o modelo de hipersensibilidade tardia à ovalbumina**, Tese Acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 104 p.

OLIVEIRA, M. A. 2005. **Proporção de forragem e teor de lipídeos na dieta de vacas leiteiras: consumo, produção e composição do leite**. Dissertação Acadêmica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 54 p.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: **Evidence and speculation: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, **1**: 223-228.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, **40**: 283–298.

PARK, Y.; YANG, M.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. 2007. Effects of conjugated linoleic acid isomers on serum tumor necrosis factor- $\alpha$  concentration in mice. **Journal of Food Biochemistry**, **31**: 252-265.

REEVES, G. P.; NIELSEN, H. F.; FAHEY Jr, C. G. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **Committee Report, 123 (11):** 1939-1951.

REYNOLDS, M. C.; ROCHE, M. H. 2010. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, DOI: 10.1016/j.plefa.2010.02.021.

RIERA, B. J.; HONTECILLAS, R.; GURI, J. A.; SCHMELZ, M. E.; MISYAK, A. S.; EVANS, P. N. 2010. Conjugated Linoleic Acid Ameliorates Inflammation-Induced Colorectal Cancer in Mice through Activation of PPAR- $\gamma$ . **The Journal of Nutrition. Nutritional Immunology, 140:** 515-521.

RIVERA, N. L. M. 2006. **Suplementação de ácido linoléico conjugado na dieta de beagles em crescimento.** Dissertação Acadêmica, Curso de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil, 104 p.

ROACH, J. A. G.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; KRAMER, G. K. J. 2002. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta, 465:** 207-226.

ROCHE, H. M.; NOONE, E.; NUGENT, A.; GIBNEY, J. M. 2001. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient?. **Nutrition Research Reviews, 14:** 173-187.

RUTH, R. M.; TAYLOR, G. C.; ZAHRADKA, P.; FIELD, J. C. 2008. Abnormal Immune Responses in fa/fa Zucker Rats and Effects of Feeding Conjugated Linoleic Acid. **Obesity, 16:** 1770–1779.

SANTANA, R. C.; CASTELOTE, C.; CASTELL, M.; RIVERO, M.; PALMERO, R. M.; FRANCH, A.; CANO, P. J. F. 2009. Long-Term Feeding of the cis-9,trans-11 Isomer of Conjugated Linoleic Acid Reinforces the Specific Immune Response in Rats. **Journal of Nutrition. Nutritional Immunology**, **139**: 76-81.

SANTOS, F. L.; SILVA, M. T. C; LANA, R. P. 2001. Efeito da suplementação de lipídios na ração sobre a produção de ácido linoléico conjugado (CLA) e a composição da gordura do leite de vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**,**30** (6):1936-1938.

SCHMID, A.; COLLOMB, M.; SIEBER, R.; BEE, G. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: **A review. Meat Science**, **73**: 29-41.

SIMOPOULOS, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids. **Biomed Pharmacother**, **56**: 365–379.

STULNIG, T.M. 2003. Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. **International Archives of Allergy and Immunology**,**132**: 310–21.

SWEENEY, B.; PURI, P.; REEN, J.D. 2005. Modulation of immune cell function by polyunsaturated fatty acids. **Pediatric Surgery International**, **21**: 335–340.

TANAKA, K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. 2005. **Journal Animal Science, Champaign**,**76**: 291-303.

WAHLE, K.W.J.; SONG, H – J.; GRANT, I.; ROTONDO, D; MOHEDE, I.; SATTAR, N.; HEYS, S.D. 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. **European Journal of Clinical Nutrition**, **59**: 508-517.

VLIES van, N.; HOGENKAMP, A.; FEAR, L. A.; ESCH van, C. B.; OOSTING, A.; HEIGNING van de, B.; BEEK van der, E.; CALDER, C. B.; GARSSSEN, J. 2011. Perinatal programming of murine immune responses by polyunsaturated fatty acids. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease** , 2 (2): 112–123.

YAQOOB, P.; CALDER, C. P. 2007. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **British Journal of Nutrition** , 98(1): 41–45.

YU, Y.; CORRELL, P. H.; HEUVEL, J. P. V. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR - dependent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1581: 89–99.

ZHANG, H.; YANG, P.; ZHOU, H.; MENG, Q.; HUANG, X. 2009. Inhibitory receptors of the immune system: functions and therapeutic implications. **Cellular & Molecular Immunology**, 6 (6): 407-14.