



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Papel do sistema chemerin/ChemR23 na sinalização
vascular da insulina de camundongos C57BL/6J e db/db**

Karla Bianca Neves

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Papel do sistema chemerin/ChemR23 na sinalização vascular da
insulina de camundongos C57BL/6J e db/db**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Karla Bianca Neves

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Oliveira

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP

Universidade de São Paulo

Neves, Karla Bianca

Papel do sistema chemerin/ChemR23 na sinalização vascular da insulina de camundongos C57BL/6J e db/db. Ribeirão Preto, 2016. 100 p., 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Oliveira, Ana Maria de.

1. Chemerin. 2. ChemR23. 3. Insulina. 4. Diabetes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Karla Bianca Neves

Título: Papel do sistema chemerin/ChemR23 na sinalização vascular da insulina de camundongos C57BL/6J e db/db.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Oliveira

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Aos meus pais, Carlos e Júlia, minhas irmãs, Stela,
Márcia e Kitty, e minha sobrinha, Luiza:
O alicerce para que eu conseguisse continuar
minha caminhada. Sou imensamente grata por
tudo.*

*Ao meu namorado, Rhéure,
pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência
sempre.*

Agradecimentos

À Deus por tudo que me permite alcançar a cada dia.

À minha família: meus pais, Carlos e Júlia, que nunca mediram esforços em proporcionar-me a melhor educação intelectual e espiritual; minhas irmãs Stela, Márcia e Kitty, por me apoiarem em todas as minhas decisões e fornecerem suporte para a busca de meus sonhos e realizações; minha sobrinha Luiza, por trazer risos e alegria à minha vida.

Ao Rhéure, mais que um namorado, um companheiro de jornada, incondicionalmente firme ao meu lado. Agradeço pelo amor, apoio e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

Aos precisosos amigos que fiz em Ribeirão Preto (minha 2ª família): Zidonia, Fernando Carneiro, Vania, Camila Zanotto, Camila Pereira, Nathanne, Pedro Afonso, Edismauro (agregado oficial do lab), pelo companheirismo, cumplicidade, amizade, incentivo, pelos sorrisos e inesquecíveis momentos compartilhados e agradável convívio sempre durante estes anos em Ribeirão Preto.

Aos amigos de laboratório, Fernando, Vania, Camila Zanotto, Camila Pereira, Thiago Bruder, Thiago Dias, Nathanne, Pedro Afonso, Rafael Menezes, Rafael Fais, Marcondes, Stéfany, Carla e Fabíola, com quem compartilhei grande parte dos meus dias durante esses anos; e com os quais aprendi diferentes forma de convivência e tornaram a rotina do laboratório em uma agradável experiência a cada dia.

Às técnicas Carla e Fabíola por todo o suporte técnico e ajuda durante todos esse anos. Sem sua ajuda o trabalho teria muito mais árduo.

À profa. Ana Maria de Oliveira, pela orientação, por todo apoio, confiança e amizade. Seus ensinamentos contribuíram imensamente para meu crescimento intelectual e pessoal.

À profa. Rita Tostes, pela oportunidade, o apoio, seja qual fossem as circunstâncias, acolhimento e orientação.

À profa. Núbia Lobato, pelas ideias e orientação essenciais durante a realização deste trabalho.

À profa. Rhian Touyz por me receber em seu laboratório em Glasgow e ter me dado essa oportunidade única.

Aos meus queridos amigos Augusto Montezano (Guto), Milton Magill, Katie, Adam, Francisco Rios e Livia, que me acolheram em Glasgow como se fossem família. Por terem sido presentes e amigos, e por terem me dado todo suporte nessa etapa da minha vida em Glasgow. Com certeza Glasgow não seria a mesma sem vocês lá!

À Universidade de Glasgow que me recebeu e possibilitou a realização do meu estágio sanduíche. Agradeço em todos os sentidos, pela estrutura proporcionada para a realização de experimentos, convivência com novas culturas e novo meio científico, e pela oportunidade.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP por me abrigar durante a realização do curso de mestrado e doutorado e pela disponibilidade da área experimental.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP pela oportunidade de realização da minha pós-graduação.

À Eleni, Rafael e Rosana, membros da secretaria da pós-graduação da FCFRP – USP, por todo eficiente trabalho, organização e ajuda nos momentos de dúvidas.

À Marlene Rodrigues da Silva, ex-secretária da Farmacologia da FCFRP - USP, por todo carinho, atenção e auxílio.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, Sonia Maria Stefanelli de Andrade, Fátima Helena Pentean e José Waldik Ramon e da seção de pós-graduação da FMRP-USP, por todo carinho, atenção e momentos de descontração.

Ao programa Ciências sem Fronteiras (CAPES), que me possibilitou uma experiência indescritível durante meu doutorado sanduíche.

Ao apoio financeiro da FAPESP (processo: 2012/13144-8; 2015/01630-3; 2013/08216-2), CNPq e CAPES (2053-13-6).

*"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las.
Que tristes os caminhos se não fora
A mágica presença das estrelas!"*
(Mario Quintana)

...

"Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes."
(Isaac Newton)

RESUMO

NEVES, KB. **Papel do sistema chemerin/ChemR23 na sinalização vascular da insulina de camundongos C57BL/6J e db/db.** 2016. 100 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Chemerin e seu receptor (ChemR23) têm sido amplamente associados à disfunção endotelial, inflamação e resistência à insulina. No entanto, é ainda desconhecido se chemerin influencia diretamente a sinalização da insulina na vasculatura. A hipótese deste estudo é de que chemerin diminui a sinalização vascular da insulina, e que o uso de antagonista de ChemR23 (CCX 832) em um modelo de diabetes do tipo 2 relacionado à obesidade melhora as respostas vasculares a insulina. Mecanismos moleculares e vasculares foram investigados em artérias mesentéricas e células de músculo liso vascular em cultura (CMLV) de camundongos C57BL/6J, db/m (controles, não obesos, não diabéticos) e db/db (diabéticos, obesos), assim como em células endoteliais (CE) de humanos em cultura. Nossos resultados mostraram que chemerin diminui a vasodilatação induzida por insulina em camundongos C57BL/6J, efeito mediado por ChemR23, PI3K/Akt e estresse oxidativo. Em CMLV, chemerin, através de mecanismos dependentes de estresse oxidativo e ChemR23, diminui a fosforilação de IRS-1, PI3K e Akt e a translocação de GLUT4 para a membrana, induzidas por insulina. Chemerin também diminui a captação de glicose induzida por insulina via estresse oxidativo e ativação de AMPK e PI3K/Akt. Em CE, chemerin diminui a sinalização de óxido nítrico (NO) ativada pela insulina, novamente via ChemR23, estresse oxidativo e PI3K/Akt. CCX 832 diminui a massa corporal (sem alterar a ingestão de ração), os níveis de insulina e glicose (sem alterar a tolerância à glicose) e estresse oxidativo em aorta e rim de camundongos db/db. CCX 832 restaura parcialmente a disfunção vascular observada em camundongos db/db, sem modificar parâmetros estruturais destas artérias. Adicionalmente, CCX 832 diminui marcadores pró-inflamatórios em tecido adiposo perivascular (PVAT) e melhora a sinalização da insulina em aorta de camundongos db/db. Nossos achados destacam o sistema chemerin/ChemR23 como um novo e promissor alvo terapêutico para limitar a resistência à insulina e as complicações vasculares associadas ao diabetes relacionado à obesidade.

Palavras-chave: Chemerin, ChemR23, Insulina, Diabetes

ABSTRACT

NEVES, KB. **Role of chemerin/ChemR23 system on vascular insulin signaling in C57BL/6J and db/db mice.** 2016. 100 p. Thesis (PhD) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2016.

Chemerin and its G protein-coupled receptor (ChemR23) have been associated with endothelial dysfunction, inflammation and insulin resistance. Whether chemerin directly influences insulin signaling in the vasculature is unknown. We hypothesized that chemerin impairs vascular insulin signaling in obesity-related type 2 diabetes, effect that would be improved by the novel ChemR23 antagonist (CCX 832). Molecular and vascular mechanisms were probed in mesenteric arteries and cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) from C57BL/6J, non-diabetic lean db/m and diabetic obese db/db mice as well as in human microvascular endothelial cells (EC). Chemerin decreased insulin-induced vasodilatation in C57BL/6J mice, effect mediated by ChemR23, PI3K/Akt and oxidative stress. In VSMC, chemerin, via oxidative stress- and ChemR23-dependent mechanisms, decreased insulin-induced IRS-1, PI3K and Akt phosphorylation, GLUT4 translocation to the membrane. In addition, chemerin decreases insulin-induced glucose uptake via oxidative stress and AMPK and PI3K/Akt activation. In EC, chemerin decreased insulin-activated nitric oxide (NO) signaling via ChemR23, oxidative stress and PI3K/Akt signaling pathway. CCX 832 decreases body weight (without altering food intake), insulin and glucose levels (without altering glucose tolerance) and oxidative stress in aorta and kidney from db/db mice. CCX 832 partially restored vascular dysfunction in db/db mice without modifying structural parameters. Additionally, CCX 832 decreases proinflammatory markers in perivascular adipose tissue (PVAT) and improves insulin signaling in aorta from db/db mice. Our findings highlight chemerin/ChemR23 system as a promising new therapeutic target to limit insulin resistance and vascular complications associated with obesity-related diabetes.

Keywords: Chemerin, ChemR23, Insulin Signaling, Diabetes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Chemerin diminui a vasodilatação induzida por insulina via ChemR23, PI3K/Akt e mecanismos dependentes de estresse oxidativo	44
Figura 2. Chemerin diminui a sinalização de NO induzida por insulina em células endoteliais	46
Figura 3. Chemerin diminui a sinalização vascular da insulina	47
Figura 4. Chemerin diminui a fosforilação de AMPK	49
Figura 5. Chemerin diminui a captação de glicose induzida pela insulina em CMLV	49
Figure 6. CCX 832 diminui massa corporal de camundongos db/db	52
Figure 7. CCX 832 diminui níveis de insulina e glicose, mas não afeta a tolerância à glicose de camundongos db/db	53
Figure 8. CCX 832 diminui massa do baço e rim, mas não diminui a massa do coração de camundongos db/db	54
Figure 9. CCX 832 atenua a disfunção vascular observada em camundongos db/db	56
Figure 10. Efeito do CCX 832 sobre a Emax da PhE, ACh, insulina e NPS em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db	58
Figura 11. CCX 832 não altera parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de camundongos db/db	59

Figura 12. CCX 832 normaliza a sinalização vascular da insulina em aortas de camundongos db/db	61
Figura 13. CCX 832 reduz estresse oxidativo em aortas de camundongos db/db	62
Figura 14. CCX 832 reduz estresse oxidativo renal em camundongos db/db	63
Figura 15. CCX 832 diminui marcadores pró-inflamatórios no PVAT de camundongos db/db	64
Figura 16. CCX 832 aumenta marcadores anti-inflamatórios no PVAT e plasma de camundongos db/db	65
Figura 17. Figura esquemática representando possíveis mecanismos pelos quais o sistema chemerin/ChemR23 modula/compromete efeitos vasculares de insulina....	68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de pD_2 da insulina em artérias mesentéricas de camundongos com endotélio incubadas com veículo, chemerin, CCX 832, YS-49 e Tiron 43
- Tabela 2.** Valores de pD_2 para PhE em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832. 55
- Tabela 3.** Valores de pD_2 para ACh em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832 56
- Tabela 4.** Valores de pD_2 para insulina em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832 57
- Tabela 5.** Valores de pD_2 do NPS em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AGLs	Ácidos graxos livres
AICAR	Ativador de AMPK
Akt	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
AST	Área da secção transversa
BSA	Albumina sérica bovina
CCX 832	Antagonista de receptores para Chemerin (ChemR23)
cDNA	DNA complementar
CMKLR1	Receptor semelhante ao de quimiocina 1
ChemR23	Receptor de chemerin
ChemR23 ^{-/-}	Animais deficientes em chemR23
CMLV	Células de músculo liso vascular
CO ₂	Monóxido de carbono
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
DCV	Doenças cardiovasculares
De	Diâmetro externo
Di	Diâmetro interno
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	Concentração efetiva de um agonista que produz 50% do efeito máximo
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
E _{max}	Efeito máximo produzido por uma agonista
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinase regulada por sinalização extracelular 1/2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1

GCs	Guanilato ciclase solúvel
GLUT4	Transportador de glicose-4
HFD	Dieta rica em gordura
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 β
IMC	índice de massa corpórea
IRS1/2	Substrato do receptor de insulina 1 e 2
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mN	MiliNewton
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
PAI-1	Inibidor de ativador de plasminogênio-1
pD ₂	logaritmo negativo da concentração de uma droga que induz 50% do efeito máximo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Solução fosfato salina
PhE	Fenilefrina
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-fosfato quinase
PKC	Proteína quinase C
PVAT	Tecido adiposo perivascular

RARRES2	Outro nome pelo qual chemerin é conhecido
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adipose marrom
TBS	Solução salina tamponada TRIS
TIG2	Gene induzido por tazaroteno 2
Tiron	4,5-dihidroxi-ácido-1,3-benzenodisulfonico dissódico monohidratado
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
YS-49	Ativador de PI3K/Akt

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos	30
2.1. Objetivos Gerais	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Animais	31
3.2. Tratamento, acompanhamento e coleta de amostras biológicas	32
3.3. Teste oral de tolerância à glicose	33
3.4. Dosagens bioquímicas no plasma, soro e na urina	33
3.5. Cultura Celular	33
3.6. Estudo da Reatividade Vascular em Artérias Mesentéricas de Resistência	34
3.7. Protocolos Experimentais	35
3.8. Estrutura e mecânica arterial	36
3.9. Quantificação Proteica por Western Blotting	38
3.10. Isolamento fração de membrana e citosol em CMLV	39
3.11. Quantificação de captação de glicose	39
3.12. Produção de óxido nítrico (NO)	40
3.13. Imunofluorescência	41
3.14. PCR em tempo real	42
3.15. Análise dos dados	44
4. Resultados	45
4.1. Efeito da adipocina chemerin na vasodilatação induzida por insulina	45
4.2. Efeito da adipocina chemerin na ativação da via do NO mediada por insulina	47
4.3. Efeito da adipocina chemerin na sinalização vascular da insulina	49

4.4. Chemerin reduz a captação de glicose induzida por insulina em CMLV	50
4.5. Efeitos do antagonismo do receptor de chemerin, ChemR23, sobre parâmetros metabólicos de camundongos db/db	53
4.6. Efeito do antagonismo de ChemR23 na disfunção vascular de camundongos db/db	57
4.7. Efeito de CCX 832 sobre os parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de camundongos db/db	60
4.8. Efeito de CCX 832 sobre a sinalização vascular da insulina em camundongos db/db	62
4.9. Efeito do tratamento com CCX 832 sobre o estresse oxidativo em tecidos de camundongos db/db	64
4.10. Efeito do antagonismo de ChemR23 sobre o perfil inflamatório do PVAT de camundongos db/db	65
5. Discussão	71
6. Conclusões	81
7. Referências Bibliográficas	82
8. Anexos	99

Introdução

1. Introdução

O tecido adiposo branco (TAB) é considerado o maior reservatório energético do organismo. No entanto, nas últimas duas décadas, foi reconhecido como um importante órgão capaz de produzir e secretar substâncias com ações endócrinas, parácrinas e autócrinas ¹⁻⁴. Dentre tais substâncias estão incluídas as adipocinas, que são proteínas ou peptídeos envolvidos na transmissão de sinais entre as células e cuja produção encontra-se alterada em complicações metabólicas relacionadas à obesidade. Alguns exemplos de adipocinas são: leptina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), adiponectina, resistina, interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β), omentina, visfatina e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) ⁵.

Adipocinas tem efeitos autócrinos/parácrinos que influenciam o desenvolvimento do tecido adiposo e diversas outras funções biológicas, incluindo a homeostase energética (metabolismo de glicose e lipídeos, apetite e termogênese), a inflamação, a imunidade, a função vascular e a pressão arterial ^{2, 6}. Desregulação da produção e secreção de adipocinas é considerado o principal contribuinte para o desenvolvimento de complicações vasculares na obesidade e doenças relacionadas [tais como diabetes tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV)] ^{4, 6, 7}. Na obesidade há um aumento dos depósitos de TAB, devido à hiperplasia e hipertrofia de seus adipócitos ⁸. O acúmulo de TAB, levando ao sobrepeso (índice de massa corporal 25-30 kg/m²) e à obesidade (índice de massa corporal \geq 30 kg/m²), está associado ao aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias, enquanto a expressão de adipocinas anti-inflamatórias mostra-se reduzida nessas condições ⁴. Uma consequência importante da produção desregulada de adipocinas pelo tecido adiposo é a resistência à insulina. A compreensão do papel da insulina em uma ampla variedade de processos fisiológicos e dos mecanismos envolvidos em suas ações pode auxiliar a compreensão das alterações nas ações/respostas à insulina, presentes em condições como a obesidade e o DM2.

A insulina é considerada o mais potente hormônio anabólico e é essencial para o desenvolvimento e crescimento apropriado dos tecidos e a manutenção dos níveis normais de glicose corporal. Ela é secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas em resposta ao aumento nos níveis circulantes de glicose e aminoácidos, como ocorre após uma refeição. A insulina regula a homeostase glicêmica, reduzindo a produção de glicose hepática e aumentando a captação de glicose, inicialmente no músculo esquelético e tecido adiposo. Este hormônio atua também no metabolismo lipídico, aumentando a síntese de lipídeos no fígado e tecido adiposo e diminuindo a liberação de ácidos graxos e triglicerídeos nestes tecidos ⁹.

A resistência à insulina é caracterizada por redução dos efeitos da insulina sobre a captação, metabolismo e armazenamento de glicose, em virtude da diminuição da sensibilidade de tecidos periféricos à ação deste hormônio. Considerando que os alvos primários para a ação da insulina são o músculo esquelético, o tecido adiposo e o fígado, o prejuízo na sinalização intracelular mediada pela insulina nestes tecidos reduz a captação de glicose e pode contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica, que é caracterizada por elevados níveis de insulina, hiperglicemia e dislipidemia. Entretanto, receptores de insulina não estão restritos a tecidos metabolicamente ativos e podem ser observados em diversos outros tipos celulares, incluindo as células vasculares ¹⁰. De fato, indivíduos com resistência à insulina apresentam prejuízo da função endotelial e aumento da frequência e severidade de DCV ⁹.

Embora esteja bem estabelecido que as consequências metabólicas da resistência à insulina por si só são suficientes para induzir alterações no sistema cardiovascular, as ações locais da insulina sobre os vasos sanguíneos são também bastante relevantes. A insulina apresenta importantes ações vasculares, dentre as quais, a estimulação da produção de óxido nítrico (NO) pelo endotélio, através de uma via dependente de fosforilação, que é distinta dos mecanismos dependentes de cálcio utilizados pelos receptores acoplados à proteína G, como ocorre com a acetilcolina (ACh) ¹¹. A via de sinalização da insulina estimulando a produção de NO em células endoteliais envolve a ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) com fosforilação e ativação da proteína quinase dependente de fosfoinosítideo-1 (PDK-1), que fosforila e ativa a Akt (ou proteína quinase B), que por sua vez ativa

diretamente a enzima NO sintase endotelial (eNOS), o que resulta em aumento da sua atividade e subsequente produção de NO^{12, 13}. Tais ações endoteliais levam à vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, favorecendo a captação de glicose pelo músculo esquelético e, deste modo, representando um papel central no acoplamento da homeostase metabólica à homeostase hemodinâmica. Além da via de sinalização dependente de PI3K que regula as ações vasodilatadoras, a insulina ativa a via de sinalização dependente de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), estimulando a produção e secreção do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) pelas células endoteliais e potencializando seus efeitos no músculo liso vascular¹⁴. A insulina atua ainda reduzindo a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca²⁺ em CMLV via ativação da fosfatase da cadeia leve de miosina e diminuindo a fosforilação da cadeia leve de miosina¹⁵. Portanto, a sinalização da insulina ocorre tanto em células endoteliais quanto em CMLV para induzir vasodilatação e envolve um equilíbrio entre seu efeito vasodilatador/anti-inflamatório/anti-aterogênico (IRS/PI3K/NO) e vasoconstritor/pró-inflamatório/pró-aterogênico (Ras/MAPK/ET-1)¹⁶.

Uma característica importante da resistência à insulina é o comprometimento da sinalização intracelular mediada por este hormônio na vasculatura. Este comprometimento ocorre de forma seletiva, uma vez que há prejuízo na capacidade da insulina em estimular a via de sinalização da PI3K, enquanto a ativação da via das MAPKs, que promove potencialização das ações da ET-1 e efeitos mitogênicos, permanece intacta e responde normalmente, ou até mesmo de forma aumentada, à insulina¹⁷⁻²¹. De fato, tem sido observado em sistemas *in vitro*, em modelos animais de resistência à insulina e em humanos insulino-resistentes, que muitos tecidos alvo da insulina, incluindo a vasculatura, exibem prejuízo significativo na sinalização da PI3K, mas mantém sensibilidade normal à insulina através da via de sinalização de MAPKs^{17, 22, 23}. A redução na sinalização mediada pela PI3K parece reduzir a atividade da eNOS, diminuindo assim a biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, o relaxamento vascular.

Por muitos anos tem sido aceito que os efeitos vasculares da insulina precedem outras irregularidades da função vascular comumente encontradas em DCV. A evidência mais convincente é derivada de um estudo com ratos obesos Zucker²⁴. Em arteríolas de ratos Zucker, o prejuízo na vasodilatação induzida por

insulina foi demonstrado na ausência de diminuição da vasodilatação promovida por acetilcolina ²⁴. Estes achados são consistentes com resultados encontrados por Katakam *et al.* (2005) e Oltman *et al.* (2006), demonstrando que artérias coronárias de ratos Zucker de 12 semanas de idade já apresentam redução da vasodilatação induzida pela insulina, enquanto a vasodilatação induzida pela acetilcolina é comprometida somente muito mais tarde, em animais entre 28 a 36 semanas de idade ^{25, 26}. A resistência vascular à insulina precedendo danos maiores também foi avaliada em modelos animais de hipertensão arterial. Em ratos espontaneamente hipertensos, a vasodilatação da aorta à insulina, mas não à ACh, é reduzida antes mesmo da instalação da hipertensão ²⁷. Sendo assim, pode-se considerar que a resistência vascular à insulina é um episódio inicial e comum a diferentes doenças que afetam o sistema cardiovascular.

Embora os mecanismos moleculares que levam à resistência à insulina não tenham sido completamente esclarecidos, estudos têm sugerido que o tecido adiposo, mais especificamente, os hormônios e as adipocinas pró-inflamatórias por ele liberadas, possuem papel essencial no controle da sensibilidade à insulina *in vivo*. Disfunções na produção destes fatores pelo tecido adiposo, com aumento das adipocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias, podem levar à resistência à insulina sistêmica. A resistência à insulina frequentemente associada ao acúmulo de tecido adiposo na obesidade contribui para uma série de alterações metabólicas e vasculares que favorecem o desenvolvimento de condições como o DM2 e DCV ²⁸.

O TNF- α , a leptina, a IL-6, a IL-1 β e a adiponectina estão entre as adipocinas mais bem caracterizadas como envolvidas no controle da sensibilidade à insulina e da função vascular ⁸. O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória derivada de células endoteliais, de CMLV e de macrófagos, além de participar da resposta imunológica e da patogenia de algumas neoplasias, está envolvido na gênese da resistência à insulina, por inibir a fosforilação de receptores de insulina ²⁹. Ele é expresso pelo tecido adiposo e seus níveis estão elevados em modelos animais de obesidade e em humanos com obesidade e DM2 ³⁰. A ausência do TNF- α ou de seus receptores resulta em melhora significativa da sensibilidade à insulina em modelos de obesidade ²⁹. Demonstrou-se também que o TNF- α apresenta efeitos sobre o sistema vascular prejudicando a dilatação dependente de endotélio em artérias de

resistência de humanos, efeito atribuído à possível redução da biodisponibilidade de NO e aumento da geração de prostanóides vasoconstritores ³¹.

De modo similar, a IL1- β , que apresenta receptores no endotélio e no músculo liso vascular, tem participação importante na gênese da resistência à insulina, podendo influenciar a resposta relaxante e contrátil por alterar o equilíbrio na geração de fatores liberados pelo endotélio e envolvidos no controle do tônus vascular. A incubação de segmentos da artéria temporal de humanos com IL1- β , assim como observado com o TNF- α , promove aumento da resposta contrátil mediada por receptores para ET-1 ³². Em vasos de resistência, o tratamento com IL1- β potencializa a resposta vasoconstritora à noradrenalina e ET-1, efeito que foi atribuído à redução no relaxamento dependente de NO observado no mesmo estudo ³³.

Outra citocina que modula a sensibilidade à insulina é a leptina ³⁴, o produto do gene da obesidade (*ob*) expresso predominantemente em adipócitos e considerada fator de sinalização do tecido adiposo para o sistema nervoso central. A descoberta da leptina ajudou a esclarecer o papel dos adipócitos como sistema endócrino e de que modo ocorre a sinalização para a ingestão de alimentos, bem como a regulação do metabolismo energético. Ocorre diminuição de leptina em resposta a baixos níveis de insulina, havendo uma relação diretamente proporcional entre as concentrações desses hormônios ³⁵. A leptina também age nos tecidos periféricos. Demonstrou-se, em roedores, que a hiperleptinemia reduz a síntese de triglicerídeos e aumenta a oxidação dos ácidos graxos em ilhotas pancreáticas, levando à disfunção das células β ³⁶. Este achado, em conjunto com a observação de que a insulina estimula a secreção de leptina, sugeriu a existência de uma regulação retrógrada negativa entre a insulina e a leptina.

A IL-6 é outra citocina que atua no metabolismo de carboidratos e lipídeos e que possui efeito pró-inflamatório. A infusão desta citocina em doses próximas às concentrações fisiológicas promove lipólise, independentemente da modulação de catecolaminas, glucagon e insulina. Este efeito se dá pela inibição da lipoproteína lipase com aumento na liberação de ácidos graxos livres (AGLs) pelo TAB ³⁷. A IL-6 é secretada por macrófagos, adipócitos e células endoteliais, e pode ter participação importante no desenvolvimento de DCV associadas à obesidade. Esta interleucina aumenta a captação basal de glicose, altera a sensibilidade à insulina, aumenta a

liberação de moléculas de adesão pelo endotélio vascular e a liberação hepática de fibrinogênio e fatores pró-coagulantes e plaquetários ³⁸. Estudo realizado por De Salvatore e colaboradores demonstrou que o tratamento crônico *in vivo* com IL-6 e IL-1 β prejudica o relaxamento induzido pela ACh em artérias mesentéricas ³³. Além disso, a incubação destes vasos com IL-1 β e TNF- α prejudica o relaxamento mediado pela ACh. Este efeito foi parcialmente atribuído ao aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) no endotélio e músculo liso de artérias mesentéricas, inativando o NO ³⁹.

Em adição às adipocinas clássicas, uma nova adipocina, denominada chemerin, foi descoberta ⁴⁰⁻⁴³. Chemerin, também conhecida como RARRES2 (*retinoic acid receptor responder protein 2*) ou TIG2 (*Tazarotene-induced gene 2*), é altamente expressa na placenta, fígado e TAB, mas é também expressa em outros tecidos, tais como pulmão, tecido adiposo marrom (TAM), coração, ovário, rins, músculo esquelético e pâncreas ^{41, 42, 44}. Chemerin é sintetizada como preprochemerin, uma proteína de 163 aminoácidos com uma sequência N-terminal (20 aminoácidos) que, posteriormente, é clivada para produzir o precursor inativo de 18 kDa, prochemerin (Chem-163) produzida principalmente por fibroblastos, mastócitos e células endoteliais ⁴⁰. Chem-163 sofre subsequentemente proteólise na sua porção C terminal ^{45, 46} para formar chemerin ativo ⁴⁷, que se liga a um receptor acoplado à proteína G_i, CMKLR1 (*chemokine-like receptor 1*) ou ChemR23, expresso em macrófagos, células dendríticas, adipócitos ⁴⁸ e em células endoteliais e de CMLV, como relatado recentemente ⁴⁹. Chemerin também ativa um outro receptor acoplado à proteína G, o GPR1, com afinidade semelhante ao ChemR23 ⁵⁰. No entanto, essencialmente, toda a sinalização induzida por chemerin tem sido atribuída à ativação de ChemR23. Além disso, chemerin é também um ligante para um terceiro receptor de quimiocina, o CCRL2 (*C-C motif chemokine receptor like-2*), embora a ligação de chemerin ao CCRL2 não parece ativar respostas intracelulares ⁵¹.

Chemerin é uma proteína presente em abundância nos fluidos inflamatórios e com associação direta a aspectos-chave da síndrome metabólica ^{40-42, 52-54}. Sua expressão em células endoteliais e tecidos inflamados e sua habilidade em recrutar macrófagos sugerem seu envolvimento em processos inflamatórios ^{40, 42, 55-58}. Neste sentido, foi demonstrada recentemente correlação positiva entre expressão de

chemerin no tecido adiposo aórtico e pericoronariano, bem como em CMLV de aorta, e processo arteriosclerótico ⁵⁹. Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que chemerin tem atividades pró-angiogênicas, bem como modula as vias de sinalização PI3K/Akt e MAPKs em células endoteliais, indicando um possível papel desta citocina regulando a função vascular ⁶⁰. Chemerin também induz diferenciação de adipócitos e adipogênese ⁴², além de afetar a homeostasia da glicose, induzindo resistência à insulina ^{53, 61}. Em adipócitos, chemerin ativa p38 MAPK, fator de transcrição nuclear kappa B e ERK1/2 (quinase regulada por sinalização extracelular 1/2). Entretanto, é importante mencionar que existem controvérsias a respeito destes efeitos, uma vez que ações anti-inflamatórias e de potenciação da captação de glicose por adipócitos estimulada por insulina também foram descritas para chemerin ^{62, 63}.

Chemerin emergiu como um biomarcador para adiposidade em seres humanos, uma vez que seus níveis estão fortemente associados a componentes da síndrome metabólica, incluindo o índice de massa corporal (IMC), níveis de triglicerídeos, pressão sanguínea e sensibilidade à insulina ^{41, 55, 64}, além de estar ligado a adipogênese via seu próprio receptor ⁴³. Em camundongos submetidos a dieta rica em gordura (HFD), a expressão de chemerin está aumentada ⁶⁵. Do mesmo modo, um aumento da expressão de chemerin em tecido adiposo branco, músculo esquelético e fígado, bem como uma redução na captação de glicose induzida por chemerin e aumento da intolerância à glicose têm sido relatadas em camundongos obesos e diabéticos db/db ^{65, 66}. Em adição, os níveis circulantes de chemerin estão aumentados em várias doenças associadas à inflamação crônica ⁶⁷⁻⁷¹ e os níveis séricos de chemerin se correlacionam positivamente com os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , IL-6 e proteína C reativa (PCR) ^{67, 72}. É importante ressaltar que camundongos deficientes (*knockout*) em ChemR23 (ChemR23^{-/-}) apresentam redução da adiposidade e massa corporal ⁷³ e a perda de peso promove uma diminuição dos níveis de chemerin ^{73, 74}. Evidências reforçam uma relação entre chemerin e DCV. No tecido adiposo epicárdico de pacientes com doença coronária arterial, os níveis de RNA mensageiro e expressão proteica de chemerin são significativamente maiores em comparação àqueles em tecidos de indivíduos saudáveis ⁷⁵. Foi relatada também uma correlação positiva entre a expressão de chemerin no tecido adiposo periaórtico e pericoronários e

aterosclerose aórtica e coronária ⁵⁹. Adicionalmente, os níveis de chemerin têm sido associados com fatores de risco cardiometabólicos e o grau de doença arterial coronariana em pacientes com estenose da artéria coronária ⁷⁶.

A compreensão do papel da insulina em uma ampla variedade de processos fisiológicos e dos mecanismos envolvidos em suas ações pode auxiliar a compreensão das alterações nas ações à insulina, presentes em condições como a obesidade e o DM2. O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de danos na secreção (Diabetes mellitus tipo 1 [DM1]) e/ou ação da insulina (DM2), acarretando distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Este quadro pode gerar disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, encéfalo, coração e vasos sanguíneos ⁷⁷.

Hiperglicemia, excesso de ácidos graxos e resistência à insulina são condições metabólicas associadas ao DM que podem mediar anormalidades na função vascular ⁷⁸. O estado hiperglicêmico pode interferir na função endotelial por meio de múltiplos fatores, dentre eles podemos citar a estimulação da atividade da proteína quinase C (PKC), proteína que inibe a atividade e/ou expressão da guanilato ciclase solúvel (GCs) e induz ativação da enzima NADPH oxidase (Nox) e desacoplamento da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), aumentando a produção de $O_2^{\cdot-}$ e estresse oxidativo vascular, com consequente inativação do NO ^{78, 79}. É amplamente conhecido que o estresse oxidativo tem papel crucial na progressão e desenvolvimento de DM e suas complicações, pois gera anormalidades metabólicas oriundas do aumento de produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em células endoteliais, fator que pode mediar a resistência à insulina, com consequente progressão a intolerância à glicose e instalação de DM com maior risco para complicações micro e macrovasculares ⁸⁰. Além disso, a disfunção endotelial tem sido amplamente estudada como um importante fator que contribui para a patogênese da doença vascular diabética. No DM, a liberação de fatores relaxantes e constritores pelo endotélio vascular é alterada, resultando em maior progressão de doença vascular e lesões em órgãos-alvo ⁷⁹. O remodelamento vascular também é uma característica dos vasos sanguíneos de pacientes diabéticos, comprometendo a função arterial e, conseqüentemente, aumentando o risco de problemas cardiovasculares nestes pacientes ⁸¹.

Chemerin já foi reconhecido por desempenhar papel crucial na sinalização da insulina e nefropatia diabética. Níveis séricos de chemerin estão significativamente elevados em pacientes com DM2 com microalbuminúria ^{82, 83}. No entanto, os mecanismos subjacentes a seus efeitos permanecem ainda obscuros. Recentemente, nosso grupo demonstrou que chemerin tem efeitos diretos na vasculatura, aumentando respostas vasculares a estímulos contráteis via ativação de MAPKs ⁸⁴. Além disso, chemerin tem sido sugerido como um agente endógeno vasoconstritor produzido pelos tecidos adiposos visceral e PVAT (tecido adiposo perivascular), modulando o tônus vascular através de ChemR23/CMKLR1 ⁴⁹. Chemerin também diminui o NO de maneira dependente da sinalização de GMPc, reduzindo o relaxamento em aorta de ratos ⁸⁵. Adicionalmente, nosso estudo demonstrou que dentre os potenciais mecanismos envolvidos nos efeitos da adipocina chemerin na vasculatura inclui-se o aumento da geração de O_2^- ⁸⁵. Apesar de ter sido demonstrado que chemerin é um potencial fator de risco para lesão vascular, poucos estudos avaliando como a adipocina chemerin interfere na função vascular são encontrados na literatura ^{49, 84, 85}.

A relação entre chemerin, DM e obesidade precisa ser minuciosamente investigada. Ainda existem muitos estudos controversos, principalmente em relação aos efeitos desta adipocina na homeostase da glicose, embora múltiplos trabalhos já mostraram que os níveis de chemerin estão aumentados em pacientes diabéticos ^{83, 86-88}. Estudo anterior mostrou que o eixo chemerin/ChemR23 prejudica a sinalização da insulina e induz resistência à insulina em células do músculo esquelético de humanos ⁵³. No entanto, resultados conflitantes são observados em adipócitos 3T3-L1. Um estudo mostra que chemerin induz resistência à insulina nesses adipócitos ⁸⁹, enquanto outro estudo mostrou que níveis elevados de chemerin melhoram a sinalização da insulina e a captação de glicose nestas células ⁶³. Recentemente, foi demonstrado aumento significativo dos níveis de chemerin em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), a qual possui características típicas de resistência à insulina, e o tratamento destes pacientes com metformina (antidiabético) melhora os sintomas da doença assim como reduz os níveis de chemerin ⁹⁰. Outro trabalho recente mostrou que chemerin diminui a captação de glicose e induz resistência à insulina em mioblastos C2C12 de roedores através da reação inflamatória mediada por NF- κ B ⁹¹. Um trabalho muito interessante mostrou

ainda aumento significativo dos níveis de chemerin em indivíduos com parentesco de primeiro grau com pacientes diabéticos do tipo 2, o que sugere que chemerin pode estar envolvido na fase inicial do desenvolvimento e progressão da resistência à insulina/diabetes ⁸⁸.

Embora evidências descrevam que chemerin prejudica a sinalização de insulina e induz a resistência à insulina em células do músculo esquelético ⁵³ e cardiomiócitos de ratos ⁹², ainda não é totalmente compreendido o papel da adipocina chemerin na resistência à insulina e se chemerin modula a sinalização vascular da insulina na obesidade e diabetes ou quais as vias de sinalização ativadas por chemerin em tais condições. Assim, a hipótese deste estudo é de que chemerin, através do seu receptor ChemR23, diminui/compromete a sinalização vascular da insulina em camundongos não-obesos, não-diabéticos (C57BL/6J) e que o antagonismo de ChemR23 atenuará as anormalidades das respostas vasculares à insulina em camundongos obesos e diabéticos (db/db).

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo é compreender os efeitos da adipocina chemerin na sinalização vascular da insulina e determinar os mecanismos (vias de sinalização) pelos quais ela modifica esta função, bem como investigar o papel do eixo chemerin/ChemR23 na resistência à insulina e complicações vasculares associadas ao DM2. Nossos estudos contribuirão para um melhor entendimento do papel dos fatores liberados pelo tecido adiposo visceral sobre a função vascular e, conseqüentemente, sobre as alterações vasculares presentes na obesidade e patologias associadas, tais como DM2, hipertensão arterial e DCV.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo incluíram:

- Determinar se chemerin altera a resposta vascular da insulina em artérias mesentéricas e CMLV de camundongos C57BL/6J;
- Determinar as vias de sinalização ativadas pela insulina alteradas por chemerin em artérias mesentéricas e CMLV de camundongos C57BL/6J;
- Determinar se o antagonismo do receptor de chemerin corrige as alterações na sinalização da insulina [receptores (IRS1/2), transportadores (GLUT4) e proteínas efetoras, mensageiros secundários (PI3K/Akt e AMPK)] em vasos sanguíneos de camundongos db/db (obesos e diabéticos) e db/m tratados com CCX 832 (antagonista de ChemR23).
- Determinar se o antagonismo do receptor de chemerin atenua processos inflamatórios e estresse oxidativo em PVAT, aorta e rim de camundongos db/db.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

O protocolo para uso de animais em experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto [protocolo nº 12.1.1593.53.0 (em anexo)] e West of Scotland Research Ethics Service (Glasgow, UK). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno, acondicionadas em ambiente com temperatura (22-26 °C) e umidade (60%) controladas e ciclos claro/escuro de 12h, com livre acesso à água e alimento.

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos com idade de 10-12 semanas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Foram também utilizados camundongos db/db machos (obesos e diabéticos; B6.BKS(D)-Lepr^{db}/J), um modelo animal de DM2, e seus respectivos controles heterozigotos não diabéticos (db/m; não-obesos e não-diabéticos), com idade entre 10 e 12 semanas, obtidos do Laboratório Jackson, Maine, EUA. Camundongos db/db são homozigotos para uma mutação espontânea no gene do receptor de leptina (Lepr^{db}), transmitido como traço autossômico recessivo e que promove defeitos na sinalização do hormônio leptina levando a hiperfagia, obesidade, hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, culminando em DM2⁹³.

3.2 Tratamento, acompanhamento e coleta de amostras biológicas

Camundongos db/m e db/db foram tratados com veículo (PEG 400/cremophor) ou CCX 832 (gentilmente cedido pela ChemoCentryx, Inc., Mountain View, CA, USA), um antagonista de ChemR23 (75 mg/kg/dia) durante 3 semanas por gavagem. Os animais foram divididos em 4 grupos: db/m + veículo, db/m + CCX 832, db/db + veículo e db/db + CCX 832. Em experimentos iniciais, dois grupos adicionais foram incluídos: camundongos db/m e db/db sem qualquer tratamento e mantidos pelo mesmo período de três semanas. Uma vez que não foi observada nenhuma diferença entre os grupos não tratados e grupos tratados com veículo, os protocolos restantes foram realizados em animais tratados com veículo e CCX 832 apenas.

A partir do início tratamento, semanalmente, após 12 horas (h) de jejum, a glicemia foi determinada por glicosímetro portátil (Accu-Chek Active®, Roche Diagnóstica), utilizando sangue de um pequeno corte feito na cauda. A massa corporal também foi coletado semanalmente a partir do início do tratamento. O consumo de ração foi avaliada nos dias zero, 3 e 7. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com isoflurano 2% em oxigênio, para coleta de sangue via perfuração do plexo retro-orbital e, a seguir, sacrificados por deslocamento cervical para retirada dos tecidos de interesse. A massa de diferentes depósitos de gordura (visceral, retroperitoneal, epididimal), do baço, rins e coração foi avaliada.

3.3 Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado ao final do tratamento. Após 12 h de jejum, a glicemia de cada animal foi verificada, por glicosímetro portátil, caracterizando a glicemia do tempo zero. Em seguida, glicose na dose de 2 g/kg foi administrada aos camundongos db/m e db/db por gavagem e novas determinações da glicemia foram feitas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min.

3.4 Dosagens bioquímicas no plasma, soro e na urina

As concentrações plasmáticas de chemerin (MCHM00, R&D Systems), insulina (Rat/Mouse Insulin ELISA, Mercodia) e adiponectina (MRP300, R&D Systems) foram mensuradas por imunoenensaio enzimático. Creatinina e albumina, na urina e soro, respectivamente, foram quantificadas por método colorimétrico disponibilizado em kit bioquímico obtido comercialmente (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa – MG, Brasil).

3.5 Cultura celular

Com o objetivo de avaliar o papel da adipocina chemerin sobre proteínas componentes da sinalização ativada pela insulina e captação de glicose induzida por insulina, utilizamos culturas celulares. Linhagem de células endoteliais da microvasculatura humana (HMEC; Life Technologies) da derme e cultura primária de células de músculo liso vascular (CMLV) de artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6J, entre as passagens cinco e oito, foram utilizadas. As células foram cultivadas em meio de cultura 131 suplementado com fator de crescimento para microvasculatura (MVGS, 25 ml), gentamicina (50 ug/ml) e anfotericina B (0,25 ug/ml), meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (50 ug/ml), respectivamente.

Para a realização da cultura primária, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) e os mesentérios foram isolados e incubados em solução de colagenase em meio de cultura F12 (3mg/mL), por 15 minutos, a 37° C, para pré-digestão. Em seguida, foi realizada a remoção do tecido adiposo mecanicamente. Os leitos vasculares mesentéricos isolados foram incubados com uma mistura de enzimas (em 12,5 mL de meio F12: 25 mg albumina sérica bovina, 25 mg colagenase, 1,5 mg elastase, 4,5 mg inibidor de tripsina), por 30 minutos, a 37°C, para digestão e remoção da camada endotelial. Posteriormente, a solução foi

passada por gradiente de agulhas de diferentes calibres (18G, 19G e 20G) visando à ruptura dos vasos por atrito e obtenção de solução homogênea. A solução foi filtrada (filtro de nylon 100µm) separando-se as CMLV. O produto final foi centrifugado (3000 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi então descartado e o pellet celular ressuspensionado em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas em estufa de CO₂ (5%), a 37° C, e o meio de cultura trocado após 24 h. Para cada protocolo de cultura de células da musculatura lisa vascular do leito mesentérico foram utilizados 8 animais.

Para os estudos funcionais, as células endoteliais (HMEC) confluentes foram deixadas durante 4 h em meio com baixo teor de soro, contendo 1% de SFB; as CMLV foram incubadas *overnight* com meio de cultura DMEM livre de SFB. Subsequentemente, as células foram estimuladas com chemerin (50 ng/mL) ou veículo (PBS 0,1% BSA). Estas concentrações foram selecionadas com base em experiências anteriores que mostram os efeitos máximos com esta concentração. Em alguns estudos, 30 minutos antes do estímulo, as células foram pré-expostas a inibidores de acordo com os protocolos experimentais. As concentrações foram selecionadas com base na literatura disponível.

3.6 Estudo da Reatividade Vascular em Artérias Mesentéricas de Resistência

Para o estudo de reatividade vascular foi utilizado o método descrito por Mulvany e Halpern⁹⁴. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. O leito mesentérico foi removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). O segundo ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 2 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio de dissecação. Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados em um miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca) para registro de tensão isométrica por um sistema de aquisição de

dados (Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália) acoplado a um computador.

As cubas do miógrafo permaneceram preenchidas com solução de Krebs aerada (95% O₂ e 5% CO₂) e aquecidas a 37°C durante todo o experimento. A tensão basal de cada segmento arterial foi calculada com o auxílio do software específico do aparelho (LabChart 8.0, ADInstruments), considerando o diâmetro interno correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg. Somente vasos com diâmetro interno entre 300 e 400 µm (vasos de resistência) foram utilizados nos protocolos de reatividade vascular.

3.7 Protocolos experimentais

Após 30 minutos do processo de normalização, as artérias foram contraídas com cloreto de potássio (KCl, 120 mM), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 15 minutos, a integridade do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à ACh (vasodilatador dependente de endotélio) em vasos pré-contraídos com fenilefrina (PhE, 2 µmol/L). Artérias mesentéricas apresentando relaxamento à ACh acima de 60% do valor da pré-contração foram utilizadas. A seguir, curvas concentração-resposta cumulativas para insulina, ACh, PhE e nitroprussiato de sódio (NPS) foram realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com PhE (2 µmol/L) e previamente incubadas com chemerin ou veículo por 1 h. Para animais db/m e db/db tratados com CCX 832, foram realizadas apenas curvas para os agonistas citados acima, sem nenhuma incubação prévia.

A fim de investigar se chemerin promove alterações de reatividade vascular à insulina, foram realizadas curvas concentração-resposta à insulina em vasos previamente incubados com chemerin ou veículo por 1 h. Para avaliar os efeitos da adipocina chemerin sobre vias de sinalização ativadas pela insulina, foram realizadas curvas concentração-resposta à insulina em vasos previamente incubados com chemerin ou veículo, na presença ou na ausência de um ativador da PI3K (YS-49, 10⁻⁶ mol/L).

Para determinar se as alterações de reatividade vascular à insulina promovidas pelo chemerin foram mediadas por modificações nas vias envolvidas na produção de ERO, curvas concentração-resposta à insulina foram realizadas em vasos previamente incubados com chemerin ou veículo, na presença ou na ausência de um sequestrador de $O_2^{\cdot-}$ (Tiron, 100 $\mu\text{mol/L}$). Quando os inibidores foram utilizados, os vasos foram incubados com os compostos por 30 minutos, os quais permaneceram durante os ensaios de relaxamento. Adicionalmente, antagonista do receptor para chemerin, ChemR23, o composto CCX832 (10 nmol/L ; gentilmente cedido por ChemoCentryx Inc., Mountain View, CA, USA) foi utilizado.

3.8 Estrutura e mecânica arterial

As propriedades estruturais e mecânicas de artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832 foram determinadas em miógrafo pressurizado (Danish Myo Tech, Modelos 110P e 111P, Aarhus, Dinamarca), baseando-se em procedimentos de publicações anteriores^{95, 96}. Segmentos das artérias mesentéricas (3 - 4 mm de comprimento) foram canulados por suas extremidades entre duas micropipetas de vidro (diâmetro de aproximadamente 100 μm) e amarrados com fio de sutura de nylon. O comprimento arterial foi ajustado até que suas paredes ficassem paralelas entre si, mas sem estiramento. Nesse momento, a pressão intraluminal foi aumentada a 140 mmHg para ajustes adicionais de comprimento e também para verificar se estavam corretamente amarradas e sem perda de pressão ao ambiente externo. Em seguida, a pressão foi reduzida para 70 mmHg sob condições de fluxo zero e as artérias foram estabilizadas por 30 minutos. As artérias foram mantidas durante todo o experimento em solução fisiológica de Krebs livre de Ca^{2+} e com adição de ácido etileno glicol tetracético (EGTA) 10 mM, gaseificada com 95% O_2 e 5% CO_2 . Após estabilização, a pressão intraluminal foi reduzida para 3 mmHg e curva pressão-diâmetro foi obtida, aumentando progressivamente a pressão intraluminal de 3 a 120 mmHg (3, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 e 120 mmHg). A pressão em cada um desses pontos de pressurização da curva foi mantida por 3 minutos para correta medição

dos diâmetros interno (D_i) e externo (D_e) das artérias pelo software específico do aparelho (MyoVIEW II, Danish Myo Tech).

Os valores de D_i e D_e foram utilizados nos cálculos dos parâmetros estruturais e mecânicos das artérias mesentéricas em condições passivas (Krebs $0Ca^{2+}$), utilizando fórmulas descritas anteriormente^{96, 97} e apresentadas a seguir:

- Espessura da parede (EP) = $(D_e - D_i)/2$

- Razão parede/lúmen = $(D_e - D_i)/2D_i$

- AST = $(\pi/4) \times (D_e^2 - D_i^2)$

- Distensibilidade incremental = $\Delta D_i / (D_i \times \Delta P) \times 100$, onde ΔD_i e ΔP representam o aumento de D_i e pressão, respectivamente, em relação ao ponto anterior da curva.

- Deformação circunferencial da parede (strain) $\epsilon = (D_i - D_0)/D_0$, onde D_0 é o D_i em 3 mmHg.

- Tensão circunferencial da parede (stress) $\sigma = (P \times D_i)/(2EP)$, onde P é a pressão intraluminal convertida para dina (dyn)/cm² (1 mmHg = $1,334 \times 10^3$ dyn/cm²).

- Relação tensão-deformação (stress-strain) = indica o nível de rigidez arterial, sendo obtido por gráfico onde são plotados os valores de σ no eixo das ordenadas e de ϵ no eixo das abcissas.

A rigidez arterial independente de geometria é determinada pelo módulo elástico de Young's [(E) = σ/ϵ]. Como a relação stress-strain é não-linear, é mais apropriado obter um módulo de elasticidade tangencial ou incremental (E_{inc}) determinando a inclinação (slope) da curva de tensão-deformação ($E_{inc} = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$). E_{inc} foi obtido por ajuste apropriado dos dados da relação stress-strain de cada animal a uma curva exponencial usando a equação: $\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\epsilon}$, onde σ_{orig} é o stress no diâmetro original, ou seja, em 3 mmHg.

Derivando a equação acima, verifica-se que $E_{inc} = \beta\sigma$. Para um dado valor de σ , E_{inc} é diretamente proporcional a β , ou seja, um aumento em β implica em aumento do E_{inc} , indicando aumento da rigidez arterial.

3.9 Quantificação Proteica por Western Blotting

A expressão proteica de receptores e componentes de vias de sinalização da insulina foi avaliada por western blotting em aorta de camundongos db/m e db/db ou CMLV de artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6J submetidas à incubação com chemerin ou veículo, na presença ou ausência de insulina e alguns inibidores.

CMLV incubadas com chemerin ou veículo (0,5 ng/mL, 1 h), insulina (100 nmol/L, 30 min) e/ou a combinação dos dois e aortas de db/m e db/db foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (coquetel inibidor de proteases ([4-2-aminoetil fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma Aldrich) acrescido de ortovanadato de sódio (10 mM), PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil, 10 mM) e coquetel inibidor de protease (1%). Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm, a 4°C, por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford⁹⁸. As amostras foram então tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitól, 200 mM) e 70 µg (CMLV) e 30 µg (aorta) de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) de 6 a 12% (variando de acordo com o peso molecular da proteína em questão) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente, por meio de aparelho da BioRad por aproximadamente 2 h a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (BSA 4%), à temperatura ambiente, por 1 h, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com diferentes anticorpos. Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (TBS 1% BSA), *overnight*, a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas com solução tampão (TBS-T) por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 h em temperatura ambiente. A solução para detecção por quimioluminescência foi utilizada como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (software ImageJ[®] [<http://imagej.nih.gov/ij/>]). Os resultados foram normalizados por β -actina, α -Tubulina

ou pelas respectivas formas total das proteínas. Foram utilizados os anticorpos: anti-eNOS, anti-fosfo eNOS, anti-fosfo Akt, anti-Akt, anti-fosfo AMPK, anti-AMPK, anti-fosfo IRS1 e anti-IRS1 (Cell Signaling; 1:1000); anti-GLUT4 (Millipore 1:1000); anti- α -tubulina e anti- β -actina (Sigma; 1:20000).

3.10 Isolamento fração de membrana e citosol em CMLV

Com o objetivo de verificar se chemerin reduz as ações da insulina por possuir efeitos sobre a translocação de transportadores de glicose (GLUT) em CMLV, as células foram estimuladas com chemerin (0,5 ng/mL, 1 h), insulina (100 nmol/L; 30 min), a combinação dos dois, CCX 832 (antagonista ChemR23; 10 nmol/L), N-acetil-cisteína (NAC; 10 μ mol/L; antioxidante) e 740Y-P (ativador de PI3K/Akt; 1 μ mol/L) por 30 minutos. Após os estímulos, CMLV foram tratadas com tampão de lise gelado (10 mmol/L Tris, pH 7,4, 1,5 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 0,2 mmol/L vanadato de sódio, 1 mmol/L PMSF, 1 g/mL aprotinina, 1 g/mL leupeptina). As amostras foram centrifugadas a 2000 g, a 4° C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 100000 g, a 4° C, durante 60 minutos. O sobrenadante resultante da ultracentrifugação foi utilizado como a fração citosólica. O sedimento (*pellet*) foi ressuspenso em tampão de lise contendo 0,1% de Triton X-100 e utilizado como a fração de membrana. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford utilizando albumina bovina (BSA) como padrão. Frações de membrana e citosol foram usadas para realizar a análise por western blotting para a translocação de GLUT4.

3.11 Quantificação de captação de glicose

Com o objetivo de quantificar a captação de glicose promovida pela insulina na presença e ausência da adipocina chemerin, CMLV privadas de SFB, estimuladas com chemerin (0,5 ng/mL) ou veículo, na presença de estímulo com insulina foram incubadas em solução tampão de Krebs-Ringer-Hepes (15 mmol/L de

Hepes [pH 7,4], 105 mmol/L de NaCl, 5 mmol/L de KCl, 1,4 mmol/L de CaCl₂, 1 mmol/L de KH₂PO₄, 1,4 mmol/L de MgSO₄ e 10 mmol/L de NaHCO₃) durante 2 h. As células foram incubadas com a insulina (100 nmol/L) durante 30 minutos e 0,2 mmol/L de glicose 2-desoxi-D-glicose contendo 1 uCi/mL de 2-desoxi-D-[³H]-glicose foi adicionada durante 30 minutos⁹⁹. O tampão foi rapidamente retirado, seguido de três lavagens com PBS gelado. Em seguida, as células foram lisadas com 500 µL de 0,4 mol/L de NaOH por 5 minutos e neutralizadas com 500 µL de HCl. A quantidade de glicose radiomarcada associada às células lisadas foi determinada por contagem líquida de cintilação.

Para esclarecer se o efeito da insulina sobre o metabolismo da glicose depende da pressão osmótica, a captação de ¹⁴C-manitol induzida pela glicose foi quantificada. Foi ainda realizado um grupo basal onde nenhum estímulo foi adicionado às CMLV. Em alguns casos, foram adicionados CCX 832 (10 nmol/L), Tiron (100 µmol/L), 740YP (ativador de PI3K; 1 µmol/L), AICAR (ativador de AMPK; 1 mmol/L) 30 minutos antes das incubações com chemerin.

3.12 Produção de óxido nítrico (NO)

Com o objetivo de investigar se chemerin diminui os níveis de NO produzido por ação da insulina em células endoteliais (HMEC), ensaios utilizando a sonda fluorescente diacetato 4-amino-5-metilamino-2',7'-diacetato difluorofluoresceína (DAF-2AM; Invitrogen, Molecular Probes) foram realizados. HMEC foram carregadas com DAF-2AM (5 µmol/L, por 30 minutos), em meio livre de SFB e contendo L-arginina (100 µmol/L), mantidas no escuro e a 37°C. As células foram lavadas com PBS 1x para remover o excesso de sonda e o meio foi substituído. As células foram então estimuladas com chemerin durante 1 h. Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas com PBS e tripsina 0,025% foi adicionada. A tripsina foi inativada com inibidor de tripsina (0,025%) em PBS (1:1). PBS foi adicionado (10 ml a 37° C) à suspensão de células e a mesma foi centrifugada durante 3 minutos a 1200 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em PBS (250 µl) e transferido (200 µl) da suspensão de células para uma microplaca preta de

96 poços (BD[®] Falcon). A nitrosilação do DAF-FM foi avaliada com um espectrofluorímetro em comprimentos de onda de excitação/emissão de 495/515 nm. A intensidade de fluorescência foi ajustada pela concentração de proteína e expressa como emissão de fluorescência por ug de proteína. Foram realizados simultaneamente grupos com L-NAME (100 µmol/L; controle negativo) e serotonina (1 µmol/L; controle positivo). Apenas no grupo contendo L-NAME, a L-arginina foi retirada do meio de cultura para a realização dos experimentos.

As células foram estimuladas com chemerin (0,5 ng/mL, 1 h), insulina (100 nmol/L; 30 min), a combinação dos dois, CCX 832 (antagonista ChemR23; 10 nmol/L), N-acetil-cisteína (NAC; 10 µmol/L; antioxidante) e 740Y-P (ativador de PI3K/Akt; 1 µmol/L) por 30 minutos.

3.13 Imunofluorescência

A fim de investigar se o tratamento de camundongos db/m e db/db com o antagonista de ChemR23 (CCX 832) diminui o estresse oxidativo nestes animais, foram realizados ensaios de imunofluorescência utilizando a sonda verde 8-Hidroxi-guanosina (8-OHG). 8-OHG é uma guanosina modificada presente no DNA/RNA, quando atacado por radicais hidroxila formados como subprodutos e produtos intermediários do metabolismo aeróbico durante o estresse oxidativo¹⁰⁰. A imunohistoquímica para 8-OHG tem sido amplamente utilizada como um biomarcador sensível e estável de danos no DNA e RNA derivados de estresse oxidativo.

As secções de aorta em parafina (4 µm) foram desparafinadas em xileno, re-hidratadas por gradiente de etanol e lavadas em água. Todas as secções foram incubadas em EDTA (pH 8) e fervidas durante 15 min a 95° C para desmascaramento do antígeno. As lâminas foram arrefecidas até à temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,5% de Triton X-100 em PBS durante 5 min, e bloqueadas em soro equino (*donkey serum*) 10%, 1% BSA em 1x TBS-T durante uma hora à temperatura ambiente numa câmara umidificada. Para imunocoloração com 8-OHG, as lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpo policlonal anti-8-OHG (Abcam ab10802, 1:200; diluído em 5% soro de burro, 0,02% BSA, 0,0025%

de Tween-20 em solução 1x TBS) numa câmara umidificada. Anticorpo secundário anti-cabra conjugado com Alexa-Fluor-488 (Molecular Probes, A-11055, 1:300, diluído em 5% soro equino, 0,02% BSA, 0,0025% Tween-20 em solução 1xTBS) foi utilizado após incubação do anticorpo primário por 1 h à temperatura ambiente no escuro. Os cortes histológicos foram tratados com 0,1% *Sudan Black* (Sigma Aldrich, 199664) em metanol durante 10 minutos a fim de remover autofluorescência. Os núcleos foram contrastados pela exposição dos slides a 4-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, a 100 ng/ml) durante 10 minutos. As secções foram montadas com lamínulas usando o meio de montagem anti-fator de decaimento de fluorescência *Prolong Gold* contendo DAPI (Molecular Probes, P-36931) no escuro. As imagens de fluorescência foram capturadas usando microscópio Axiovert 200M com um módulo de varredura a laser LSM 510 (Carl Zeiss, Heidelberg, Alemanha). Para controles negativos, lâminas apenas com IgG de cabra foram utilizados (Santa Cruz, sc-2028).

3.14 PCR em tempo real

A expressão do RNAm de marcadores inflamatórios foi avaliada em tecido adiposo perivascular (PVAT) de camundongos db/m e db/db pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real). O PVAT que circunda as artérias mesentéricas foi retirado do animal e rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Os tecidos congelados foram homogeneizados e colocados em tubos contendo 1mL de Trizol[®] (isotiocianato de guanidina em solução de fenol) (Invitrogen-EUA). Após a incubação do homogenato durante 5 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol[®]. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, a 4°C); a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo e foram acrescentados 500 µL de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e incubados a -20°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e 1 mL de

etanol absoluto foi adicionado ao *pellet*. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 12000 *g*, por 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi vertido, e o *pellet* deixado à temperatura ambiente por 5-10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 10 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato). A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 nm) no aparelho Nanodrop® (Thermo Scientific, USA). O critério de pureza utilizado foi a razão 260/280 nm (ácido nucléico/proteína) de aproximadamente 1,8. Uma razão menor que 1,8 é indicativo de contaminação por proteínas. A concentração foi fornecida em ng/µL, e foram utilizados para leitura 2 µL de amostra.

A reação de transcrição reversa é o processo pelo qual o ácido ribonucleico (RNA) é usado como um molde para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Para esta reação foi utilizado o Kit Multiscrib reverse transcription (Multiscrib RT®, Life Technologies). A reação foi preparada com 2 µL de tampão (10x), 2 µL de solução de sondas (*primers*) randômicas (10x), 0,8 µL de solução de trifosfatos desoxirribonucleótídeos (dNTPs) (25x), 1 µL de solução de enzima Multiscrib RT (50 U/µL), 1 µL de inibidor de RNase (20 U/µL), 0,25 µL de solução de primers oligo-dT (0,5 µg/µL), 5 µL de cada amostra de RNA (200 ng/µL), totalizando um volume de 20 µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos e a 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até as reações de PCR em tempo real. A expressão dos genes foram quantificadas pelo sistema TaqMan (Life Technologies). Este sistema utiliza sonda fluorescente para permitir a detecção de produto específico conforme este se acumula durante os ciclos de PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante sinalizador (*reporter*) fluorescente na extremidade 5' e um corante silenciador (*quencher*) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do silenciador reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante sinalizador através da transferência de energia por ressonância de fluorescência através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após a um dos *primers* e é clivada pela atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante sinalizador do corante silenciador, aumentando o sinal do primeiro, além de remover a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. As amostras foram incubadas a 50°C por 2 minutos e, em

seguida, a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto no aparelho 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi realizada em um volume final de 13 µL contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK. Foram analisados os seguintes genes (Life Technologies): IL-6, TNF- α , MCP-1, adiponectin.

Foi fixado um valor de limiar (*threshold*) para cada gene. O *threshold* é um nível de sinal do corante sinalizador normalizado utilizado para determinação do Ct (ciclo *threshold*) em ensaios de tempo real. Ele deve ser ajustado acima do sinal fluorescente de fundo emitido durante os primeiros ciclos antes do instrumento de PCR em tempo real detectar a amplificação do produto (baseline). O Ct é o número do ciclo no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*. Os valores de Ct são logarítmicos e são usados para as análises quantitativas. A expressão gênica foi analisada pelo método de $2^{\Delta\Delta Ct}$. A média de Ct e desvio padrão das duplicatas foram calculados. Se o desvio padrão foi maior que 0,2 ciclos, o valor da duplicata mais discrepante foi excluído e a média, recalculada. As expressões relativas (gene alvo/gene controle interno [*housekeeping*]) foram calculadas pelo método $2^{\Delta\Delta Ct}$, e os resultados são apresentados como unidades arbitrárias expressas relativamente ao controle.

3.15 Análise dos dados

O conjunto de dados de cada protocolo experimental foi expresso em média \pm E.P.M. e a diferença entre os valores médios foi analisada por teste *t* de Student não paramétrico ou por análise de variância de uma (One-Way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni, utilizando-se programa GraphPad Prism (Graph Pad Prism 5.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

4. Resultados

4.1 Efeito da adipocina chemerin na vasodilatação induzida por insulina

A potência da insulina em induzir vasodilatação foi significativamente menor em artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6J incubadas com chemerin por 1 h quando comparada àquela em vasos tratados com veículo (Figura 1A; Tabela 1). Como chemerin atua via receptor ChemR23, foi utilizado um antagonista deste receptor, o composto CCX 832. A diminuição da resposta vasodilatadora promovida pela insulina observada na presença de chemerin foi bloqueada na presença de CCX 832 (Figura 1B; Tabela 1). Do mesmo modo, um ativador da via de sinalização PI3K/Akt (YS-49) e um sequestrador de O_2^- (Tiron) reverteram a diminuição da vasodilatação pela insulina induzida por chemerin (Figuras 1C e 1D; Tabela 1). A incubação das artérias mesentéricas com YS-49 e Tiron não alterou as curvas concentração-efeito para insulina.

Tabela 1. Valores de pD_2 da insulina em artérias mesentéricas de camundongos com endotélio incubadas com veículo, chemerin, CCX 832, YS-49 e Tiron.

Grupos	pD_2
Veículo	7.8 ± 0.1 (n=9)
Chemerin	7.1 ± 0.1 (n=9) *
CCX 832	8.2 ± 1.0 (n=4)
CCX 832 + Chemerin	7.5 ± 0.2 (n=5) #
YS-49	8.2 ± 0.2 (n=4)
YS-49 + Chemerin	7.7 ± 0.2 (n=5) #
Tiron	8.1 ± 0.09 (n=4)
Tiron + Chemerin	8.2 ± 0.2 (n=5) #

Os dados representam a média ± E.P.M (n=4-9/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo, (#) grupo chemerin. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

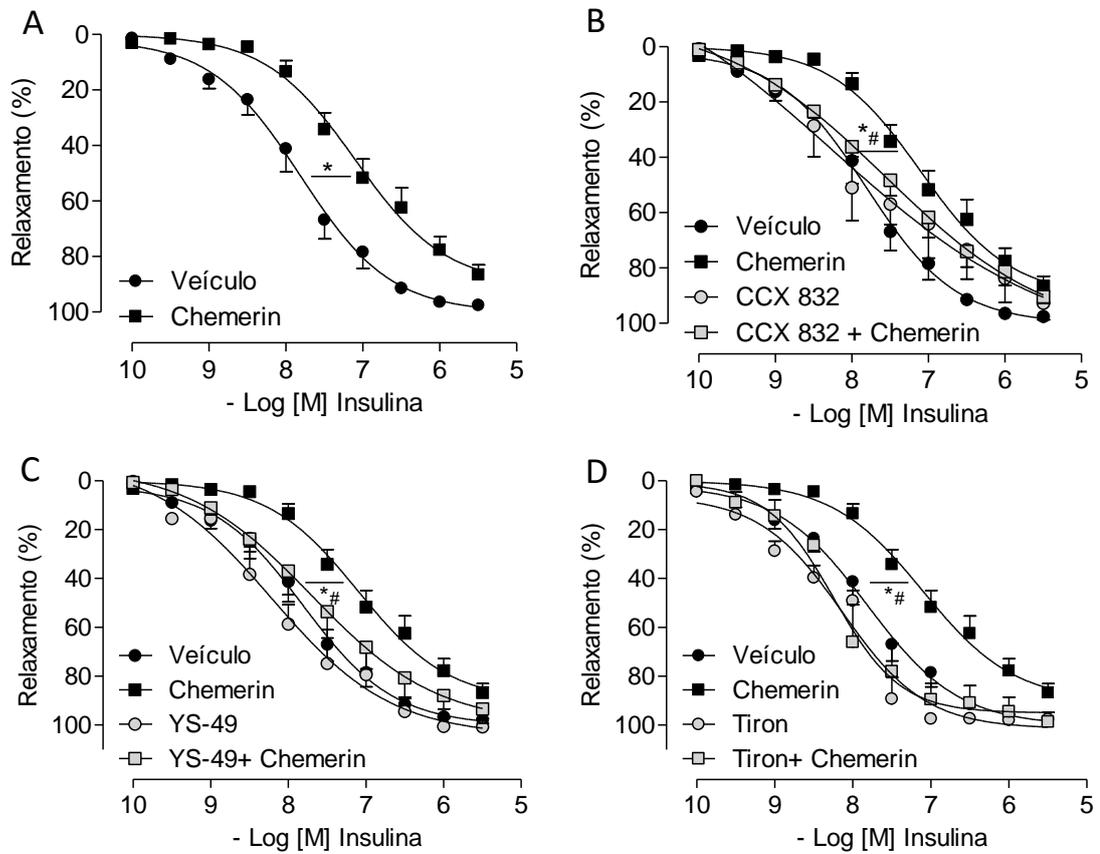


Figura 1. Chemerin diminui a vasodilatação induzida por insulina via ChemR23, PI3K/Akt e mecanismos dependentes de estresse oxidativo. As figuras mostram curvas concentração-efeito para insulina (A) em artérias mesentéricas de camundongos incubadas com veículo ou chemerin na presença e ausência de antagonista do receptor para chemerin, CCX 832 (B), YS-49 (C) e Tiron (D). Os dados representam média \pm E.P.M dos valores de relaxamento. (n=4-9 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo, (#) grupo chemerin. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.2 Efeito da adipocina chemerin na ativação da via do NO mediada por insulina

Células endoteliais foram expostas a chemerin, insulina, a combinação dos dois, CCX 832, 740Y-P (ativador de PI3K/Akt) e NAC (antioxidante) e primeiramente a fosforilação da eNOS foi investigada. A insulina induziu aumento da fosforilação do sítio ativador (Ser¹¹⁷⁷) da eNOS enquanto chemerin diminuiu essa fosforilação em relação ao grupo incubado com veículo, bem como diminuiu a fosforilação da eNOS induzida pela insulina (Figura 2A). Estes efeitos foram atenuados por NAC e 740Y-P (Figura 2A).

Para determinar se a reduzida fosforilação da eNOS induzida por chemerin está associada à diminuição da produção de NO, os níveis de NO foram mensurados também em células endoteliais. A insulina aumentou os níveis de NO e chemerin diminuiu significativamente a produção de NO induzida pela insulina nessas células. Este efeito envolveu ChemR23, PI3K e mecanismos dependentes de ERO uma vez que CCX 832, 740Y-P e NAC reverteram parcialmente os efeitos de chemerin (Figura 2B), indicando que o estresse oxidativo e um déficit na sinalização da PI3K/Akt estão envolvidos nos efeitos da adipocina chemerin sobre a resposta endotelial à insulina, diminuindo a biodisponibilidade de NO.

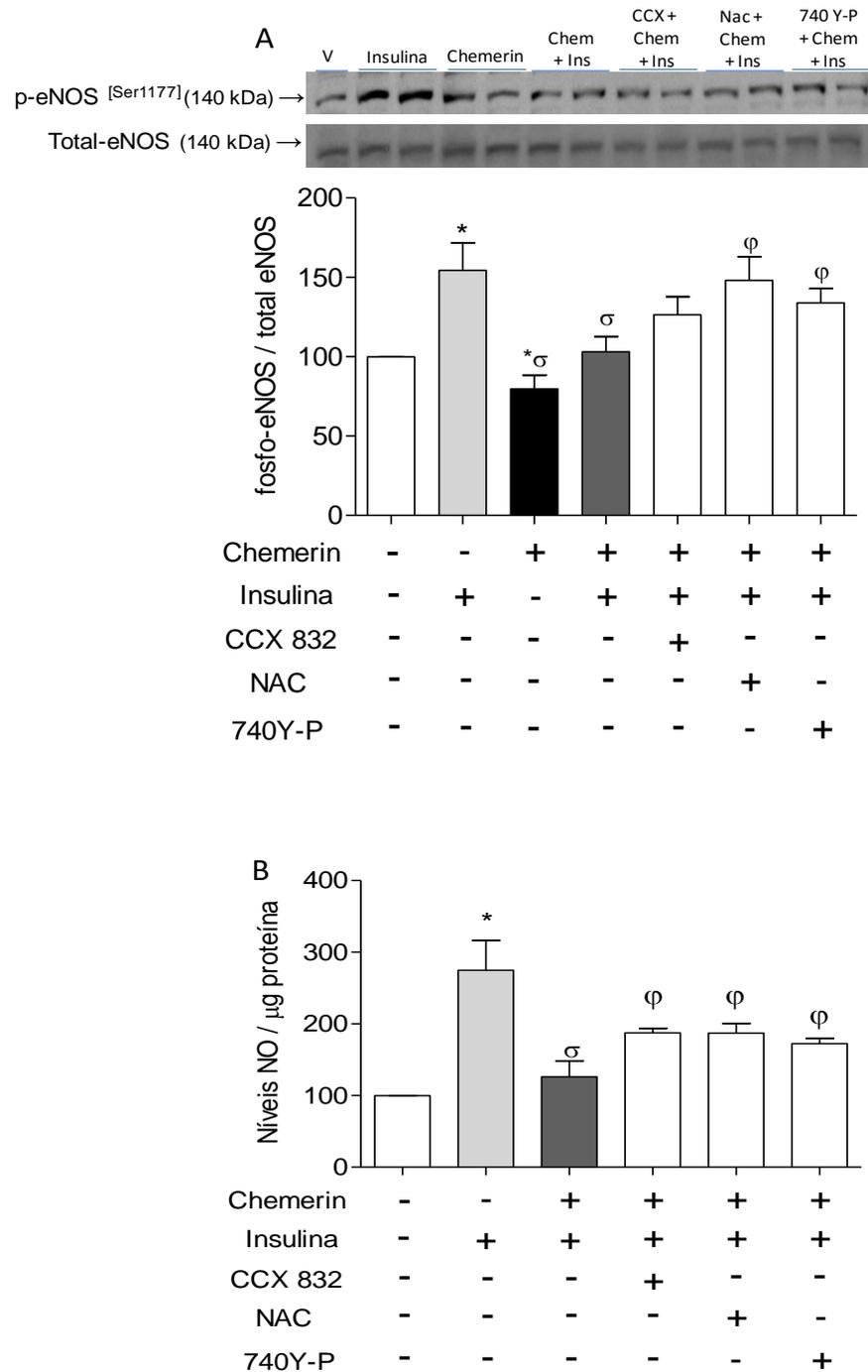


Figura 2. Chemerin diminui a sinalização de NO induzida por insulina em células endoteliais. (A) Fosforilação do sítio ativador da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) foi determinada por western blot em células endoteliais estimuladas com chemerin (0.5 ng/mL, 1 h) e insulina (30 min) na presença ou ausência de CCX 832 (antagonista ChemR23), NAC (sequestrador de ERO) ou 740Y-P (ativador de PI3K). Valores foram normalizados pela expressão de eNOS total. (B) Produção de óxido nítrico (NO) foi determinada por DAF2-AM em células endoteliais e os valores foram normalizados pela quantidade de proteína. Barras representam média \pm E.P.M (n=5-6 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo, (σ) vs. insulina, (ϕ) vs. chemerin + insulina. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.3 Efeito da adipocina chemerin na sinalização vascular da insulina

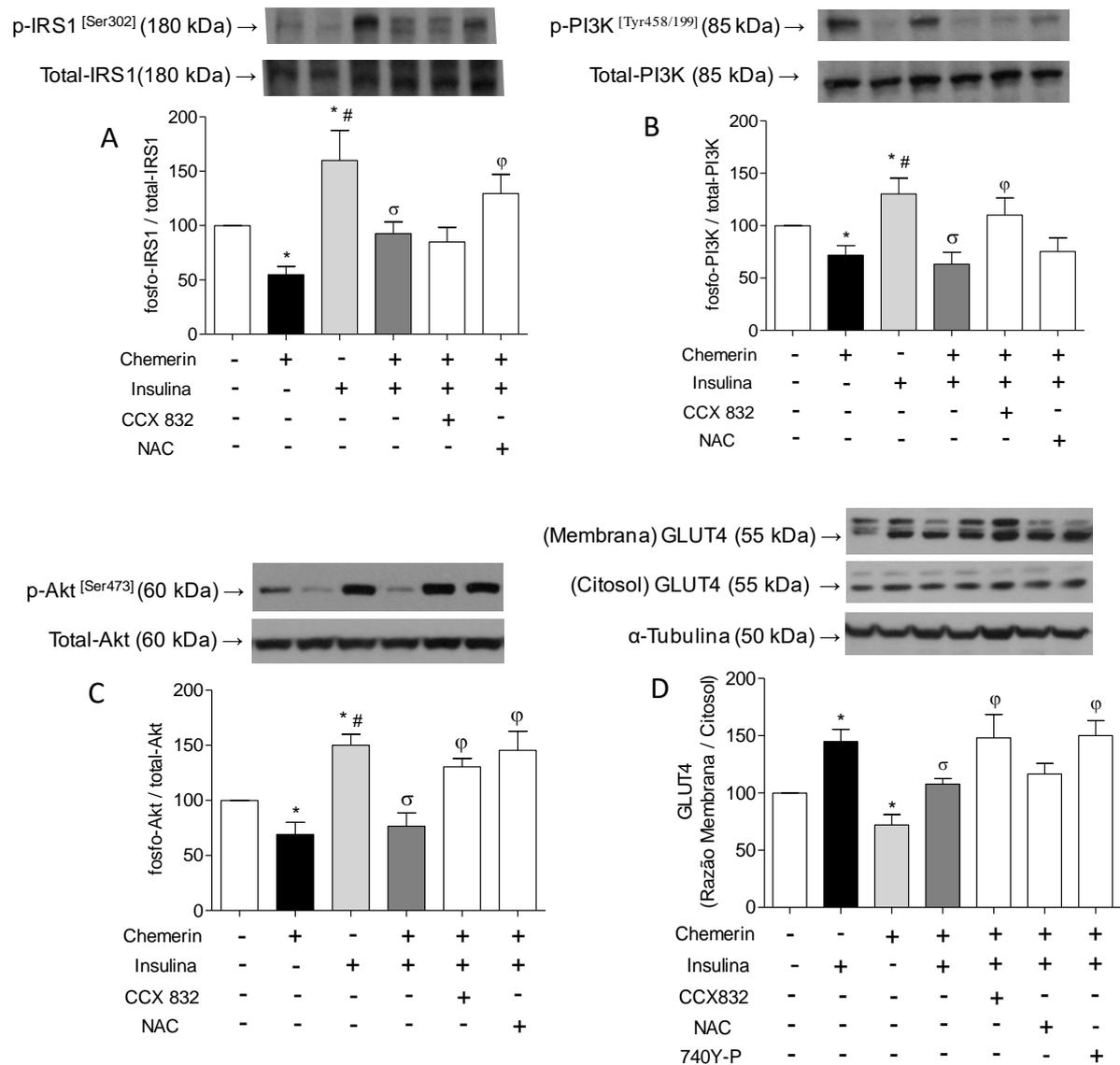


Figura 3. Chemerin diminui a sinalização vascular da insulina. A fosforilação do IRS-1 (A), PI3K (B), Akt (C) e a translocação de GLUT4 (D) foi determinada por western blot em CMLV. As células foram pré-tratadas com CCX 832, NAC ou 740Y-P 30 minutos antes da incubação com chemerin e/ou insulina. Os valores foram normalizados por expressão de proteína total ou α -tubulina. Barras representam média \pm E.P.M (n=5-6 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo, (#) grupo chemerin, (σ) vs. insulina, (ϕ) vs. chemerin + insulina. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Em adição aos seus efeitos sobre as células endoteliais, chemerin diminuiu a sinalização da insulina em CMLV. A insulina aumentou a fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) em CMLV, a qual foi reduzida por tratamento simultâneo com chemerin. Os efeitos de chemerin dependem da formação de ERO, mas não da ativação de ChemR23 (Figura 3A). A insulina também aumentou a fosforilação de PI3K e de Akt em CMLV e chemerin diminuiu a fosforilação de ambas proteínas induzida por insulina através de ChemR23 e mecanismos dependentes de ERO (Figuras 3B e 3C).

A fim de investigar se chemerin possui efeitos sobre a migração de transportadores de glicose, a translocação de GLUT4 do citosol para a membrana foi determinada. Em CMLV, chemerin diminuiu a translocação para a membrana de GLUT4 induzida pela insulina (Figura 3D). Este efeito foi bloqueado por CCX 832 e 740Y-P (Figura 3D), sugerindo que ChemR23 e a ativação de PI3K contribuem para os efeitos de chemerin sobre a captação de glicose em CMLV.

4.4 Chemerin reduz a captação de glicose induzida por insulina em CMLV

Os efeitos de chemerin sobre a fosforilação da AMPK (proteína quinase ativada por AMP), um mecanismo alternativo para a captação de glicose, também foram avaliados. Chemerin diminuiu a fosforilação da AMPK (Thr¹⁷²) tanto em CMLV quanto em células endoteliais (Figuras 4A e 4B).

Para avaliar se chemerin também afeta a captação de glicose induzida pela insulina, a captação de 2-desoxiglicose (2-DG) foi quantificada em CMLV expostas a 2 μ Ci/mL de 2-[³H]DG na presença de 2-DG não marcada. Chemerin diminuiu a captação de glicose induzida por insulina (Figura 5) de maneira dependente da geração de ERO e ativação das vias de sinalização AMPK e PI3K/Akt, uma vez que Tiron, AICAR (ativador de AMPK) e 740Y-P reverteram os efeitos de chemerin no transporte de glicose induzido por insulina em CLMV (Figura 5).

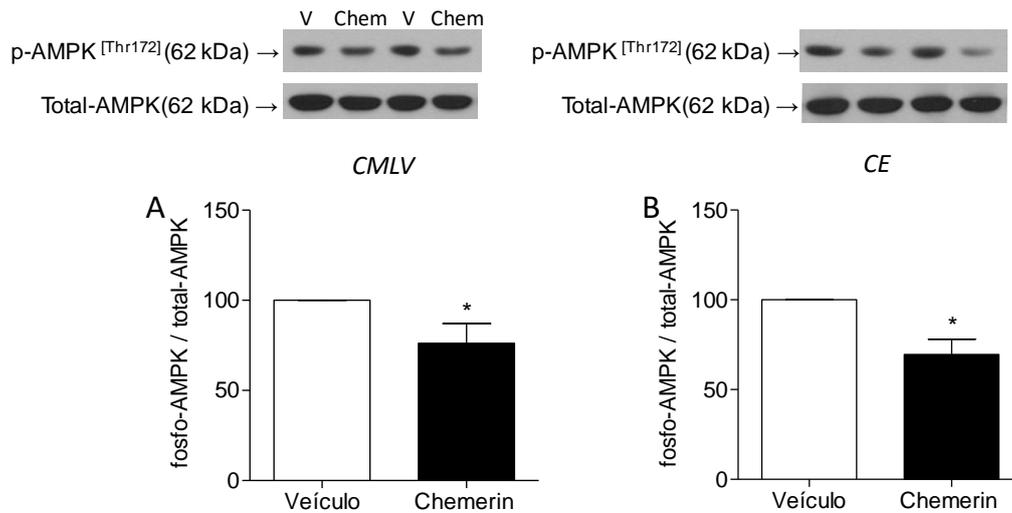


Figura 4. Chemerin diminui a fosforilação de AMPK. A fosforilação de AMPK foi determinada por western blot em CMLV (A) e células endoteliais (B). As células foram incubadas com chemerin por 1 h. Os valores foram normalizados pela expressão total de AMPK. Barras representam média \pm E.P.M (n=6 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo. Teste *t* de Student.

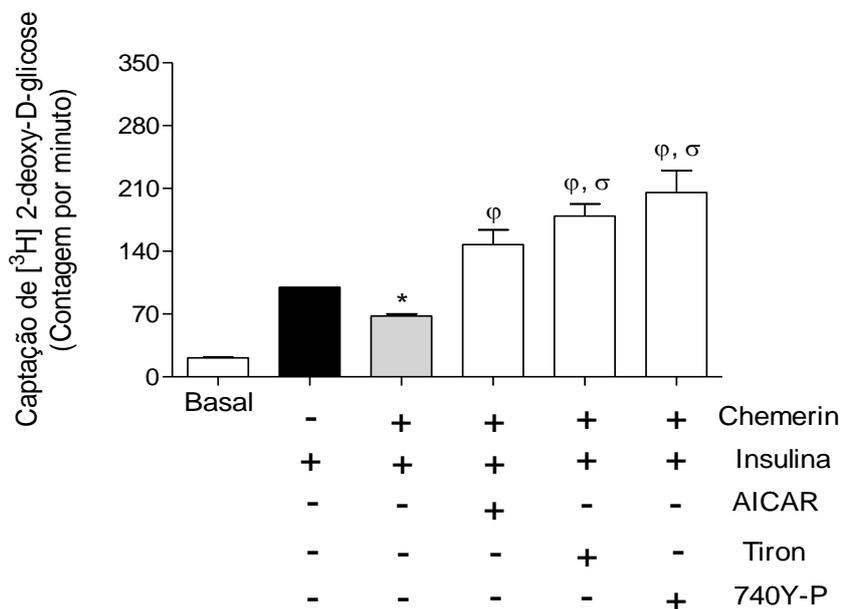


Figura 5. Chemerin diminui a captação de glicose induzida pela insulina em CMLV. Quantificação da captação de glicose induzida pela insulina em CMLV de artérias mesentéricas de camundongos incubadas com chemerin (0,5 ng/mL) por 1 h. Os gráficos mostram a contagem de células radiomarcadas com $[^3\text{H}]$ 2-deoxy-D-glicose por minuto. Os dados representam média \pm E.P.M. dos valores de contagem de células radiomarcadas por minuto (n=5-6/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo veículo, (σ) grupo insulina, (ϕ) grupo chemerin + insulina. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Conclusões parciais 1

- *Chemerin diminui a vasodilatação induzida por insulina via ChemR23, PI3K/Akt e mecanismos dependentes de estresse oxidativo em artérias mesentéricas de camundongos não-obesos não-diabéticos.*
- *Chemerin diminui a fosforilação de eNOS e produção de NO induzida por insulina em células endoteliais via ChemR23, PI3K/Akt e estresse oxidativo.*
- *Chemerin diminui a sinalização vascular da insulina via ChemR23, estresse oxidativo e diminui a translocação de GLUT4 em CMLV via ChemR23, estresse oxidativo e ativação da via de sinalização PI3K/Akt.*
- *Chemerin diminui a captação de glicose induzida pela insulina em CMLV por mecanismos dependentes da ativação das vias de sinalização AMPK e PI3K/Akt e estresse oxidativo.*

4.5 Efeitos do antagonismo do receptor de chemerin, ChemR23, sobre parâmetros metabólicos de camundongos db/db

Considerando que chemerin diminuiu a sinalização da insulina em CMLV e células endoteliais e a captação de glicose em CMLV, predominantemente via receptor ChemR23, camundongos obesos e diabéticos db/db foram tratados com antagonista deste receptor, o composto CCX 832. É importante salientar que camundongos db/db apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de chemerin quando comparados a camundongos não-obesos e não-diabéticos db/m (Figura 6A).

Após o tratamento dos animais com CCX 832, foi observada redução da massa corporal dos camundongos db/db na terceira semana de administração da droga (Figura 6B). Nenhuma diferença foi observada entre a massa de animais db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figura 6B). Confirmando o dado mencionado anteriormente, houve redução na massa total do tecido adiposo dos camundongos db/db tratados com CCX 832 (Figura 6C). Não houve diferença no consumo de ração entre os grupos db/db e db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figura 6D).

Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de glicose (Figura 7A) e insulina (Figura 7B) entre camundongos db/m e db/db ao final do tratamento, ou entre animais db/m tratados com veículo ou CCX 832. No entanto, houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicose e insulina em animais obesos e diabéticos db/db, efeito atenuado pelo tratamento com CCX 832 (Figura 7A e 7B). Quando a glicemia de jejum foi obtida semanalmente, foi observada redução significativa dos níveis de glicose em camundongos db/db a partir da segunda semana de tratamento, efeito que permaneceu até o final do tratamento (Figura 7C). Adicionalmente, animais db/db apresentaram tolerância à glicose, no entanto o tratamento com CCX 832 não alterou tal resposta (Figura 7D). Nenhuma diferença foi observada entre camundongos db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figura 7D).

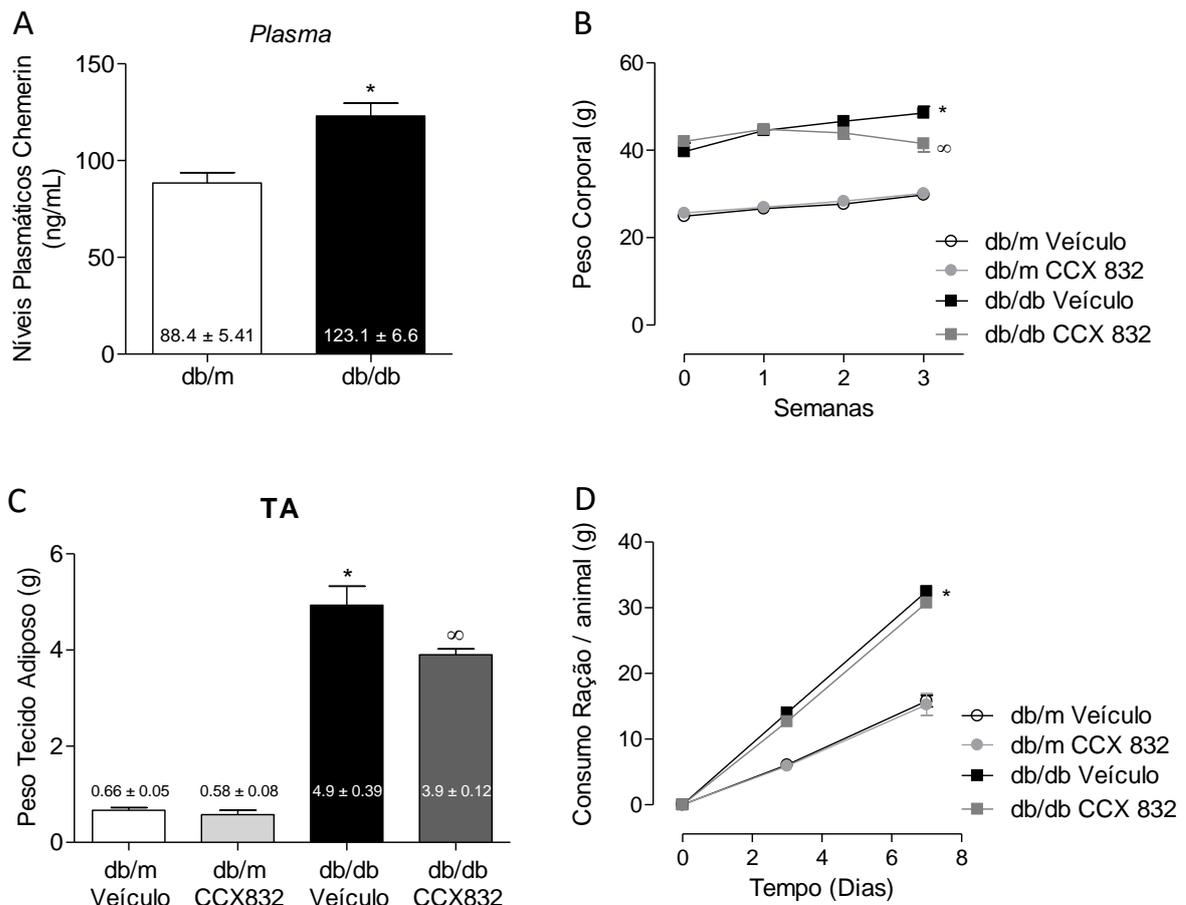


Figure 6. CCX 832 diminui massa corporal de camundongos db/db. (A) Níveis plasmáticos de chemerin foram avaliados por Elisa em camundongos db/m e db/db. (B) Massa corporal de animais db/m e db/db foram coletados durante as três semanas de tratamento. (C) Massa do tecido adiposo total de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. (D) Quantificação do consumo de ração nos dias zero, 3 e 7 do tratamento em camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Os dados representam média ± E.P.M (n=5-8/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. Teste *t* de Student ou ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

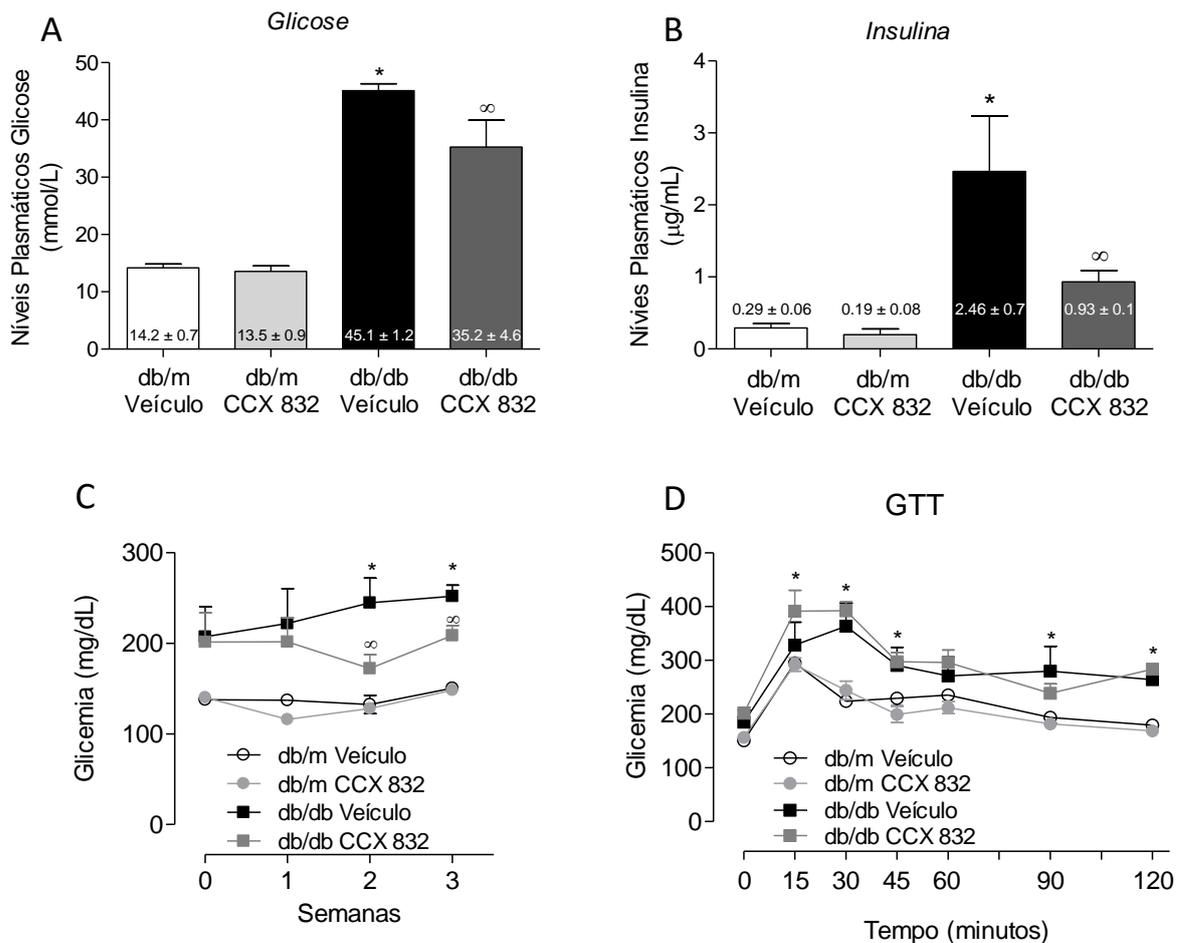


Figure 7. CCX 832 diminui níveis de insulina e glicose, mas não afeta a tolerância à glicose de camundongos db/db. Níveis plasmáticos de glicose (A) e insulina (B) avaliados em camundongos db/m e db/db ao final do tratamento. (C) Glicemia de jejum avaliada semanalmente em camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. (D) Teste de tolerância à glicose realizado ao final do tratamento de animais db/m e db/db. Valores representam média ± E.P.M (n=5-8/grupo). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Em animais db/db foi observado aumento na massa do baço, efeito revertido após o tratamento com CCX 832. As massas do coração e rim de camundongos db/db também mostraram-se aumentadas em relação aos animais db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figuras 8B e 8C, respectivamente). O tratamento destes animais com o antagonista de ChemR23 sutilmente diminuiu a massa do rim, mas não afetou a massa do coração (Figuras 8B e 8C). Nenhuma diferença foi observada

nas massas do baço, rim e coração entre animais db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figuras 8A, 8B e 8C).

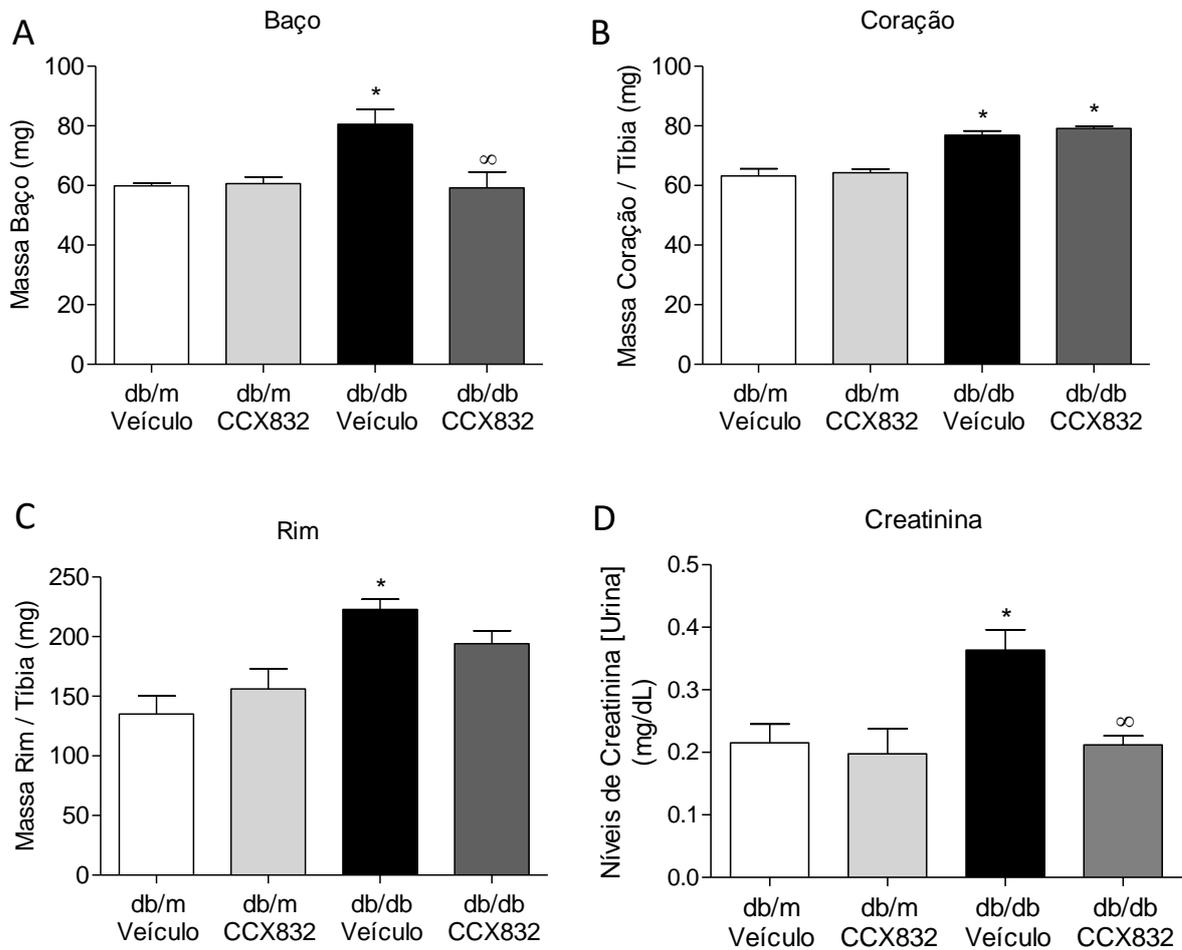


Figure 8. CCX 832 diminui massa do baço e rim, mas não diminui a massa do coração de camundongos db/db. Massa do baço (A), rim (B) e coração (C) de camundongos db/m e db/db ao final do tratamento com veículo ou CCX 832. (D) Níveis de creatinina dosados na urina de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Valores representam média ± E.P.M (n=5-8/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.6 Efeito do antagonismo de ChemR23 na disfunção vascular de camundongos db/db

A resposta máxima (E_{max}) de vasoconstrição induzida por PhE em camundongos db/m não foi alterada pelo tratamento com CCX 832. Entretanto, o aumento na vasoconstrição induzida pela PhE observado em camundongos db/db foi atenuado pelo tratamento com o antagonista do receptor de ChemR23 (Figuras 9A e 10A). Não houve diferença nos valores de pD_2 entre os grupos (Tabela 2).

Adicionalmente, a vasodilatação (E_{max}) induzida por ACh foi menor em camundongos db/db, um efeito parcialmente revertido pelo tratamento com CCX 832 (Figuras 9B e 10B). Similarmente, a resposta vasodilatadora (E_{max}) da insulina em artérias mesentéricas de camundongos db/db foi reduzida e, novamente, o tratamento com CCX 832 atenuou esta alteração (Figuras 9C e 10C). Não houve diferença significativa nos valores de pD_2 entre os grupos estudados (Tabelas 3 e 4). Em relação à vasodilatação promovida por NPS, não foram observadas diferenças entre os grupos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832 (Figura 9D, Tabela 5). Nenhuma alteração na vasodilatação induzida por ACh, NPS e insulina foi observada em camundongos db/m submetidos ao tratamento com CCX 832 (Figuras 9A, 9B e 9C).

Tabela 2. Valores de pD_2 para PhE em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832.

Grupos	pD_2
db/m	6.2 ± 0.04 (n=10)
db/db	6.4 ± 0.04 (n=11)
db/m + CCX 832	6.4 ± 0.08 (n=6)
db/db + CCX 832	6.5 ± 0.04 (n=7)

Os dados representam a média ± E.P.M (n=6-10/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

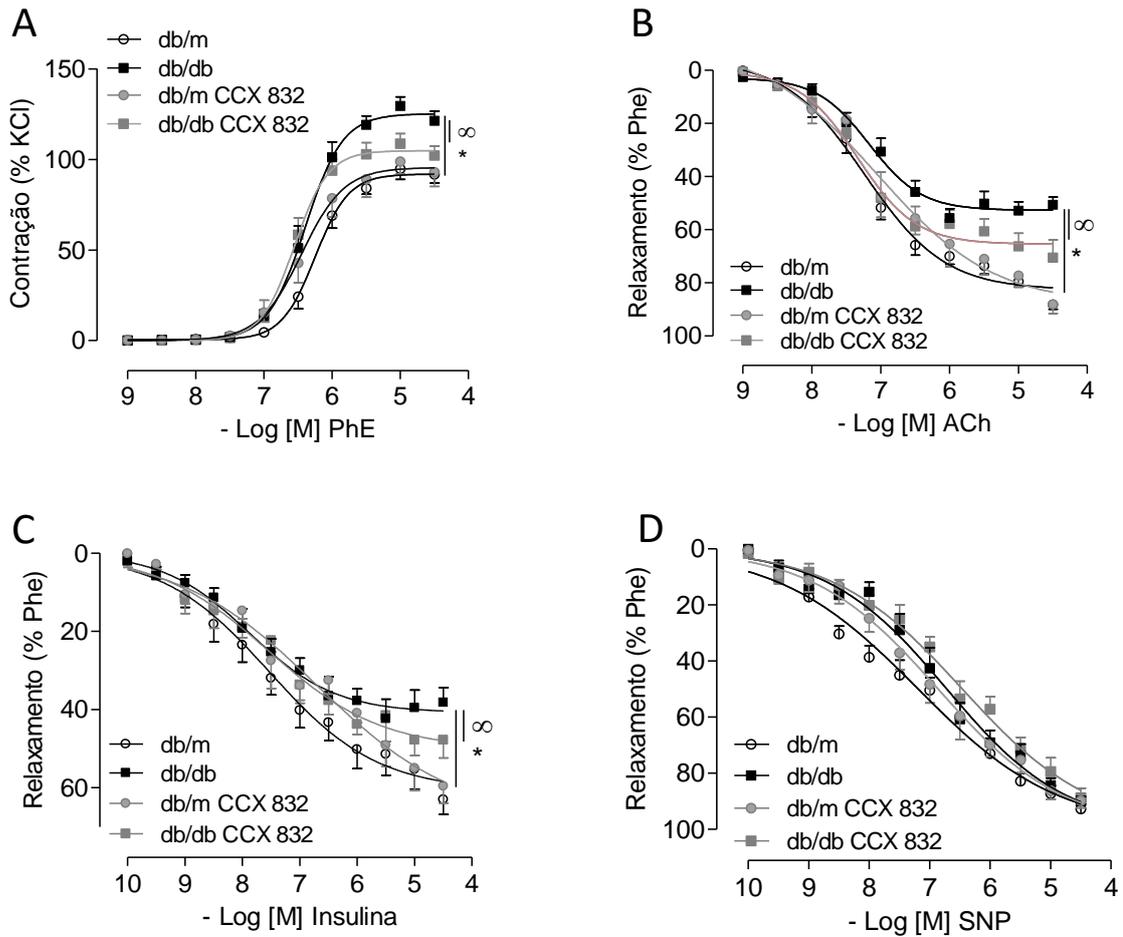


Figure 9. CCX 832 atenua a disfunção vascular observada em camundongos db/db. Os gráficos mostram curvas concentração-efeito para PhE (A), ACh (B), insulina (C) e NPS (D) em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Os dados representam média \pm E.P.M (n=6-10 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Tabela 3. Valores de pD_2 para ACh em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832.

Grupos	pD_2
db/m	7.2 \pm 0.09 (n=10)
db/db	7.2 \pm 0.10 (n=11)
db/m + CCX 832	7.0 \pm 0.24 (n=6)
db/db + CCX 832	7.3 \pm 0.13 (n=7)

Os dados representam a média \pm E.P.M (n=6-10/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Tabela 4. Valores de pD_2 para insulina em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832.

Grupos	pD_2
db/m	7.5 ± 0.21 (n=10)
db/db	7.8 ± 0.17 (n=11)
db/m + CCX 832	7.0 ± 0.41 (n=6)
db/db + CCX 832	7.5 ± 0.24 (n=7)

Os dados representam a média ± E.P.M (n=6-10/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Tabela 5. Valores de pD_2 do NPS em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com CCX 832.

Grupos	pD_2
db/m	7.2 ± 0.06 (n=10)
db/db	6.7 ± 0.07 (n=11)
db/m + CCX 832	6.9 ± 0.08 (n=6)
db/db + CCX 832	6.5 ± 0.07 (n=7)

Os dados representam a média ± E.P.M (n=6-10/grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

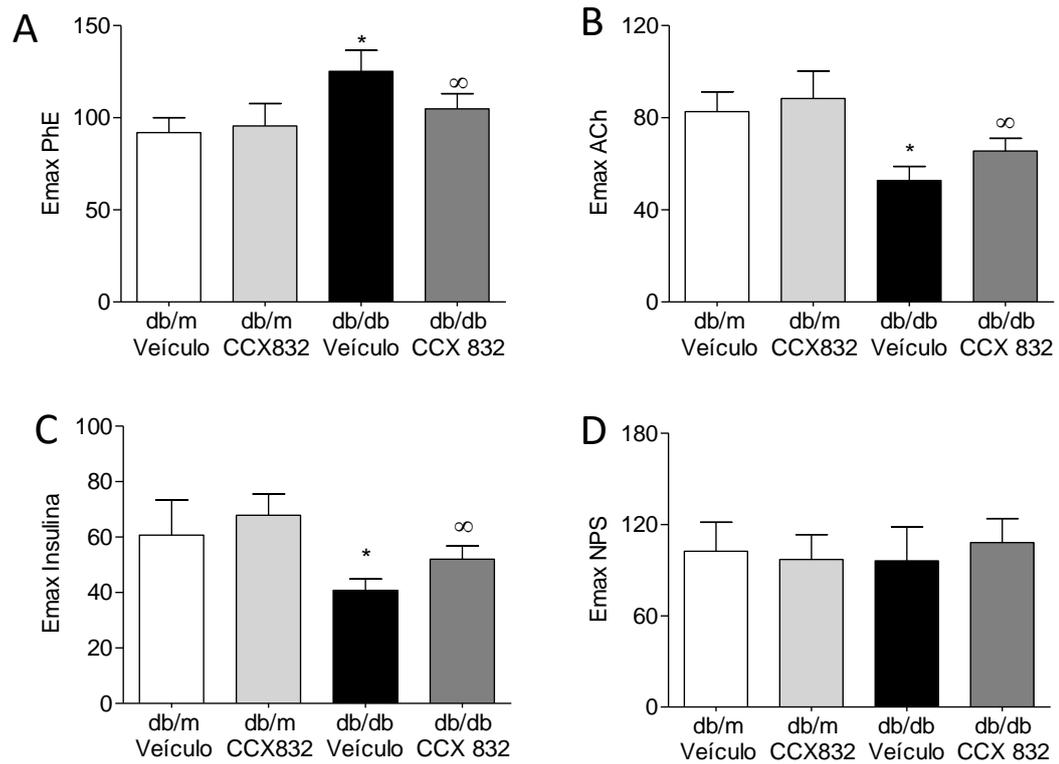


Figure 10. Efeito do CCX 832 sobre a Emax da PhE, ACh, insulina e NPS em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db. As figuras mostram os valores de Emax da PhE, ACh, insulina e NPS em artérias mesentéricas de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Os dados representam média \pm E.P.M (n=6-10 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.7 Efeito de CCX 832 sobre os parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de camundongos db/db

Os diâmetros externo (Figura 11A) e interno (Figura 11B) foram similares entre as artérias mesentéricas dos grupos experimentais db/m veículo ou CCX 832. Entretanto, tanto o diâmetro externo quanto o interno dos vasos de animais db/db mostraram-se significativamente elevados. O tratamento com CCX 832 não reduziu os diâmetros externo e interno dos vasos destes animais (Figuras 11A e 11B respectivamente).

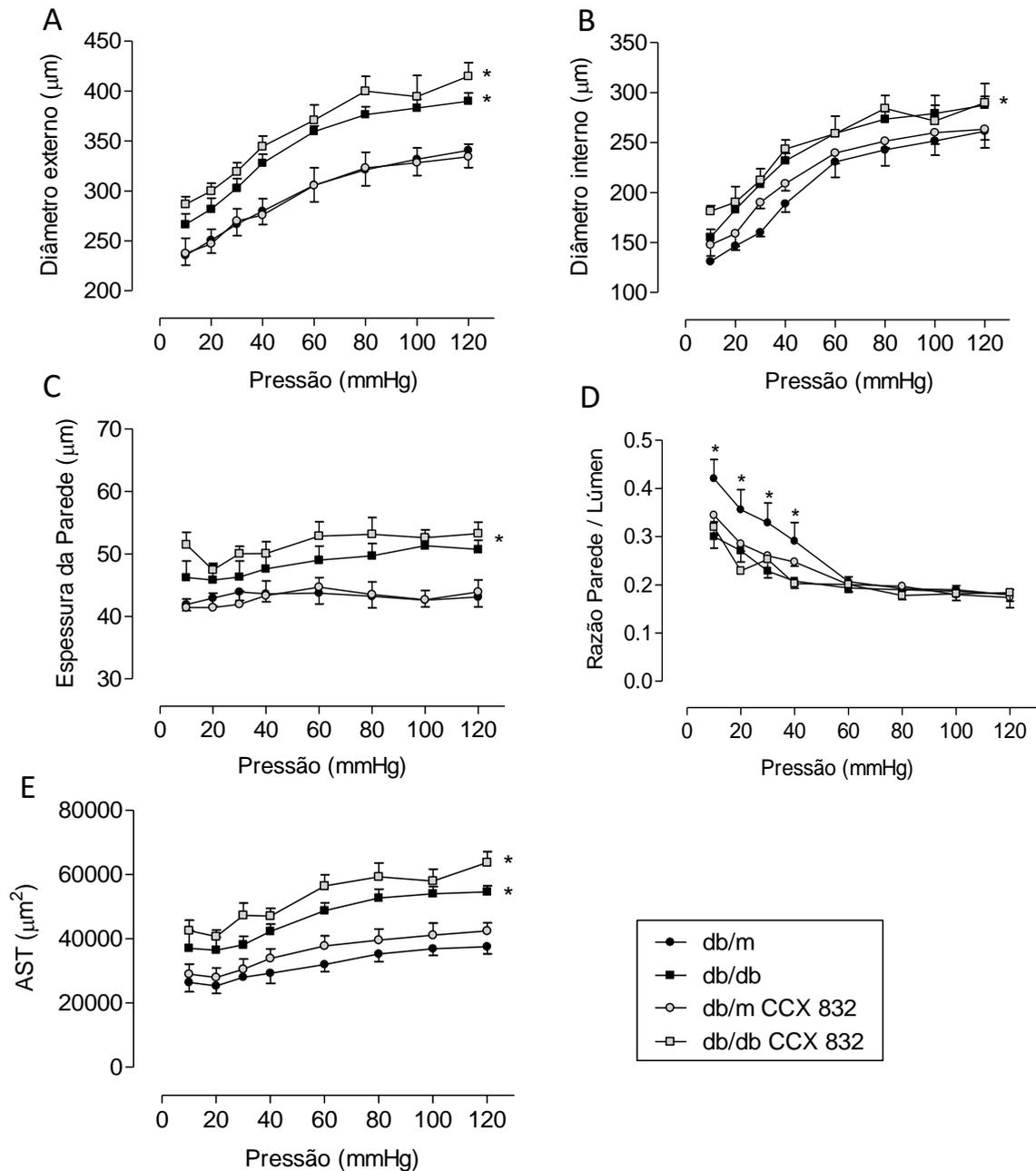


Figura 11. CCX 832 não altera parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de camundongos db/db. Diâmetro externo (A), diâmetro interno (B), espessura da parede (C), razão parede:lúmen (D) e AST (E) em artérias mesentéricas de camundongos db/db e db/m tratados com CCX 832 ou veículo por 3 semanas. Valores foram obtidos em artérias gradualmente pressurizadas em condições passivas (Krebs $0Ca^{2+}$). Os dados representam média \pm E.P.M (n=6-10 para cada grupo). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

A espessura da parede (Figura 11C), razão parede:lúmen (Figura 11D) e AST (Figura 11E) foram significativamente maiores em artérias do grupo diabético tratado com veículo em comparação aos demais grupos. Novamente, nenhuma dessas alterações estruturais em artérias mesentéricas dos camundongos db/db foram atenuadas pelo tratamento com CCX 832 (Figuras 11C, 11D e 11E).

4.8 Efeito de CCX 832 sobre a sinalização vascular da insulina em camundongos db/db

A fim de avaliar o papel do antagonismo de ChemR23 sobre a sinalização vascular da insulina, a fosforilação de diferentes membros da principal via de sinalização ativada pela insulina em aortas de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832 foi investigada. Como observado na figura 12, a fosforilação de IRS-1 (Ser³⁰²), PI3K (Tyr⁴⁵⁸/Thr¹⁹⁹) e Akt (Ser⁴⁷³) foi menor em aorta de camundongos db/db se comparada àquela em animais db/m tratados com veículo ou CCX 832 (Figuras 12A, 12B e 12C, respectivamente). Após o tratamento com CCX 832, este efeito foi atenuado (Figuras 12A, 12B e 12C). Não houve diferença significativa na fosforilação destas proteínas entre os grupos db/m veículo e db/m CCX 832.

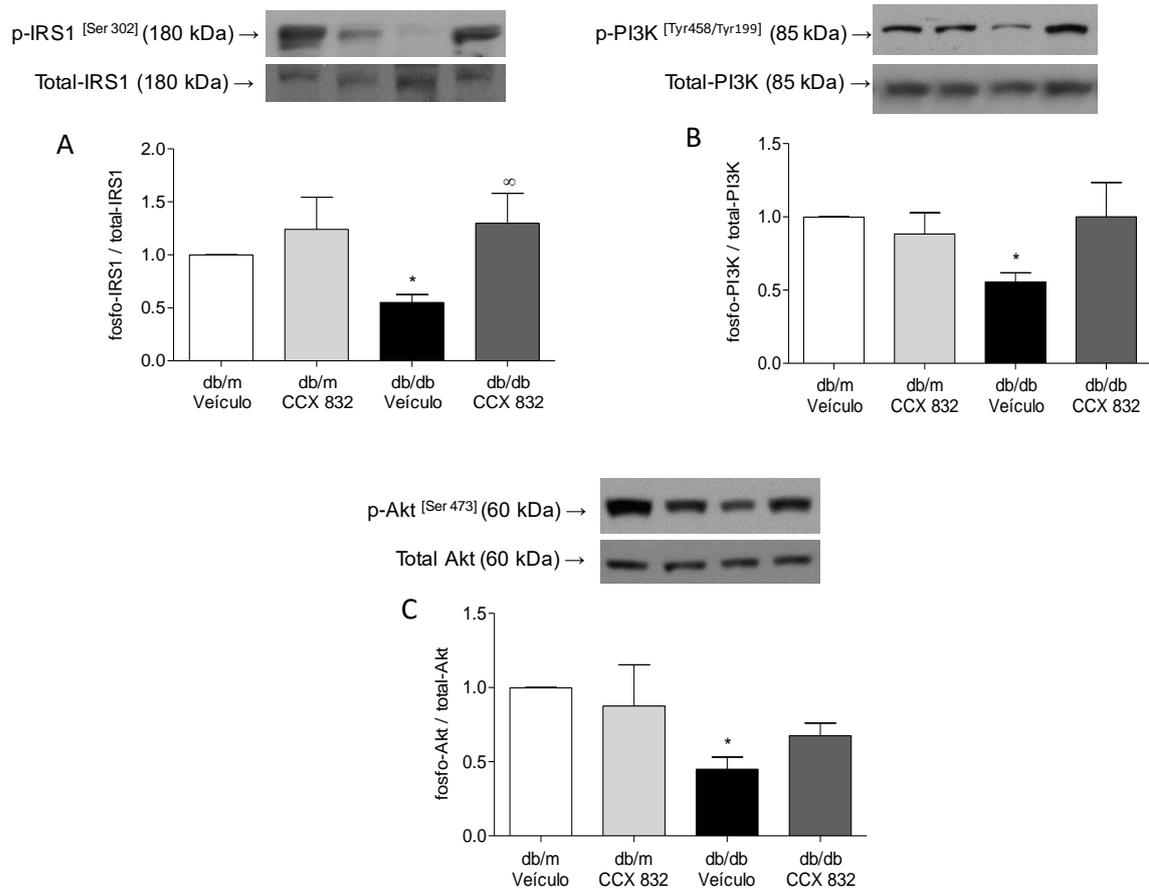


Figura 12. CCX 832 normaliza a sinalização vascular da insulina em aortas de camundongos db/db. A fosforilação do IRS-1 (A), PI3K (B) e Akt (C) foi determinada por western blot em aortas de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Os valores foram normalizados pela expressão das respectivas proteínas total. Barras representam média \pm E.P.M (n=5-8 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.9 Efeito do tratamento com CCX 832 sobre o estresse oxidativo em tecidos de camundongos db/db

Considerando que o estresse oxidativo medeia os efeitos de chemerin sobre o prejuízo da resposta vasodilatadora induzida pela insulina em artérias mesentéricas de camundongos, a geração de ERO em aortas e rins de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832 também foram avaliados.

Animais db/db apresentaram aumento de estresse oxidativo em aorta (Figuras 13A e 13B) e rim (Figuras 14A e 14B), efeito atenuado pelo tratamento com CCX 832. Não houve diferença significativa entre os grupos db/m veículo e db/m CCX 832.

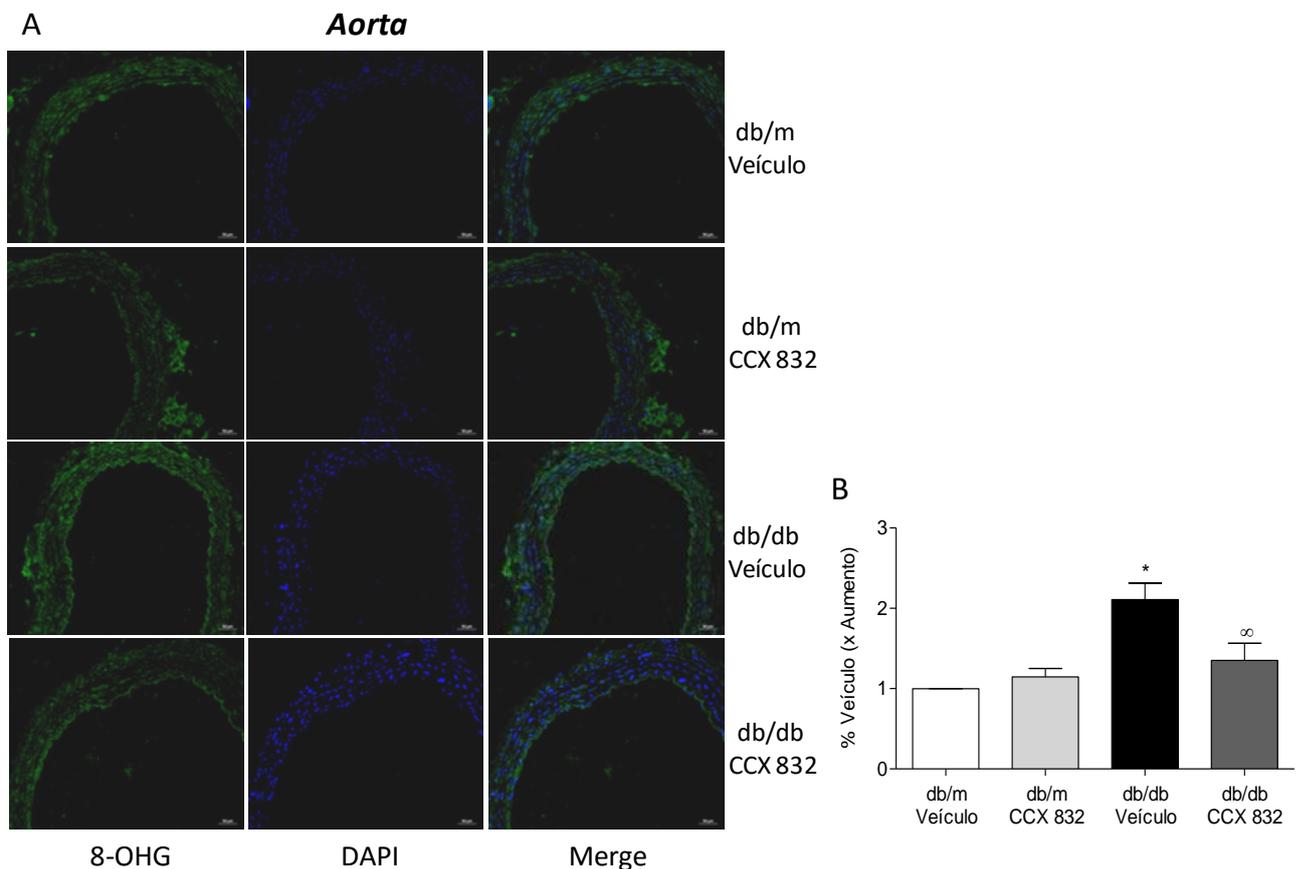


Figura 13. CCX 832 reduz estresse oxidativo em aortas de camundongos db/db. (A) Imagens representativas e (B) análise quantitativa de núcleos positivos para 8-OHG em aortas com endotélio intacto de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Escala = 50 μ m; Aumento: 20X. Resultados representam a média \pm E.P.M (n=5 para cada grupo). Significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

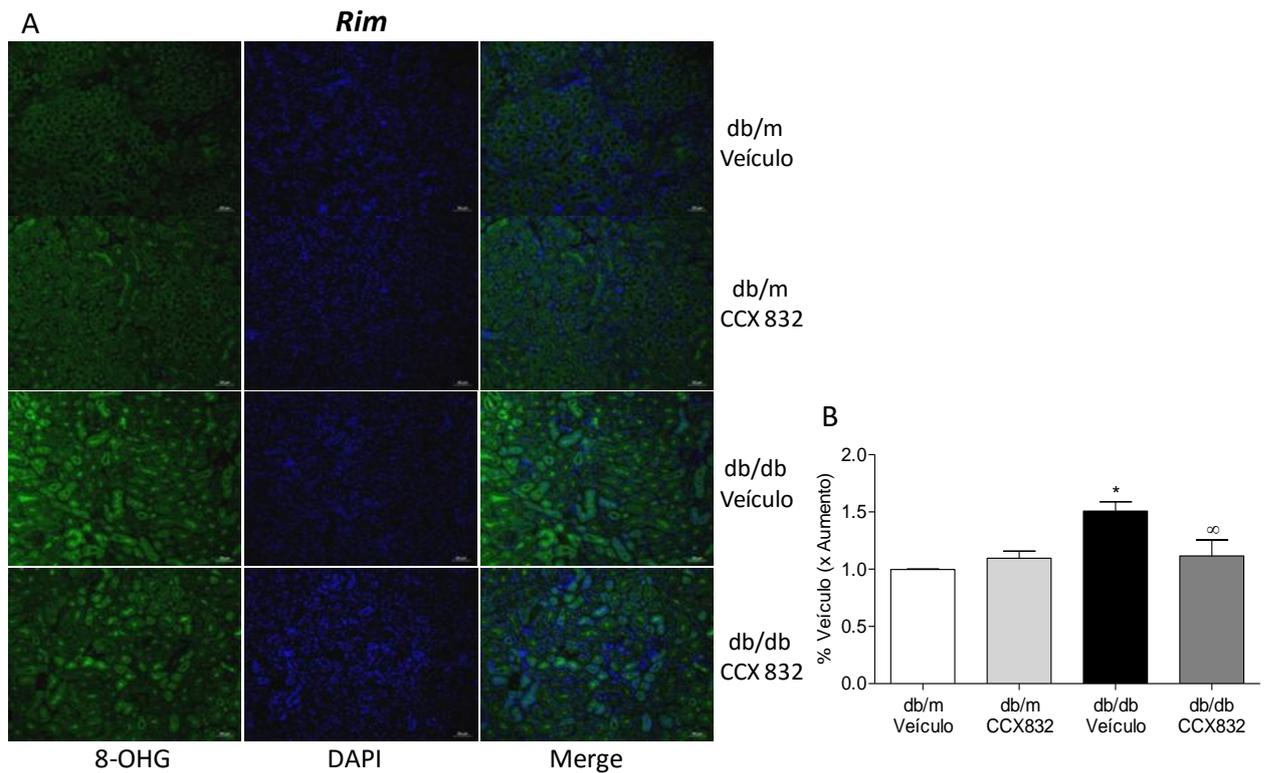


Figura 14. CCX 832 reduz estresse oxidativo renal em camundongos db/db. (A) Imagens representativas e (B) análise quantitativa de núcleos positivos para 8-OHG em rins de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Escala = 50 μ m; Aumento: 20X. Resultados representam a média \pm E.P.M (n=5 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

4.10 Efeito do antagonismo de ChemR23 sobre o perfil inflamatório do PVAT de camundongos db/db

A fim de investigar se a inflamação do PVAT de camundongos db/db também é afetada pelo antagonismo de ChemR23, foram avaliados marcadores inflamatórios no PVAT dos animais tratados com CCX 832 e veículo. Camundongos db/db apresentaram aumento na expressão de RNAm das adipocinas pró-inflamatórias TNF- α e MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) (Figuras 15A e 15B) bem como diminuição dos níveis plasmáticos e RNAm de adiponectina, adipocina anti-inflamatória (Figuras 15C e 15D), no PVAT. A expressão de RNAm dos marcadores pró-inflamatórios (TNF- α e MCP-1) no PVAT de animais db/db foi normalizada pelo

tratamento com CCX 832, retornando aos níveis observados nos animais controle (db/m veículo e db/m CCX 832) (Figuras 15A e 15B). Não foi constatada diferença significativa nos níveis de RNAm de IL-6 entre os animais db/m e db/db tratados com veículo e CCX 832 (Figura 15C). Em relação aos níveis de adiponectina, camundongos db/db tratados com CCX 832 apresentaram reversão parcial dos níveis plasmáticos e reversão total da expressão gênica desta adipocina (Figuras 16A e 16B). Não houve diferença significativa entre os grupos db/m veículo e db/m CCX 832.

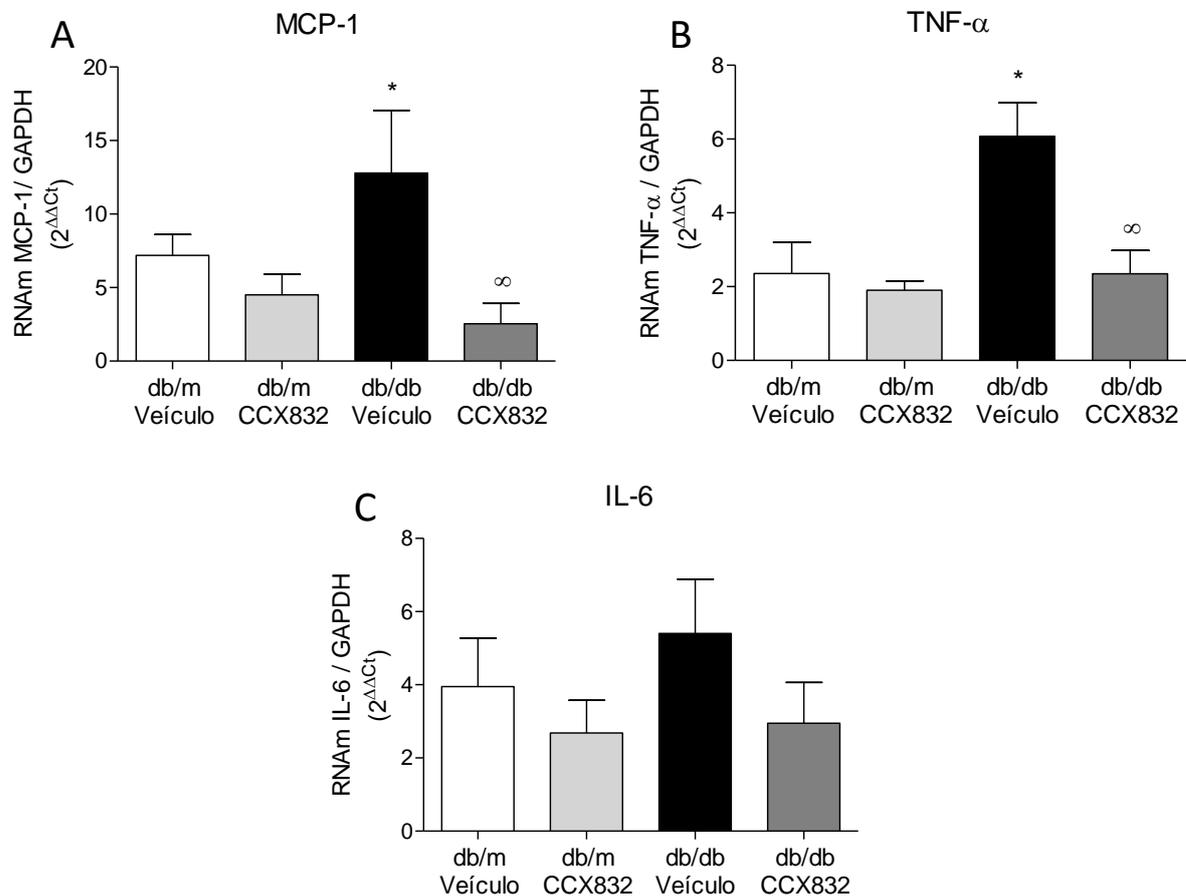


Figura 15. CCX 832 diminui marcadores pró-inflamatórios no PVAT de camundongos db/db. Expressão de RNAm de MCP-1 (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) avaliada por PCR em tempo real em PVAT de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. Resultados representam a média \pm E.P.M (n=5-8 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

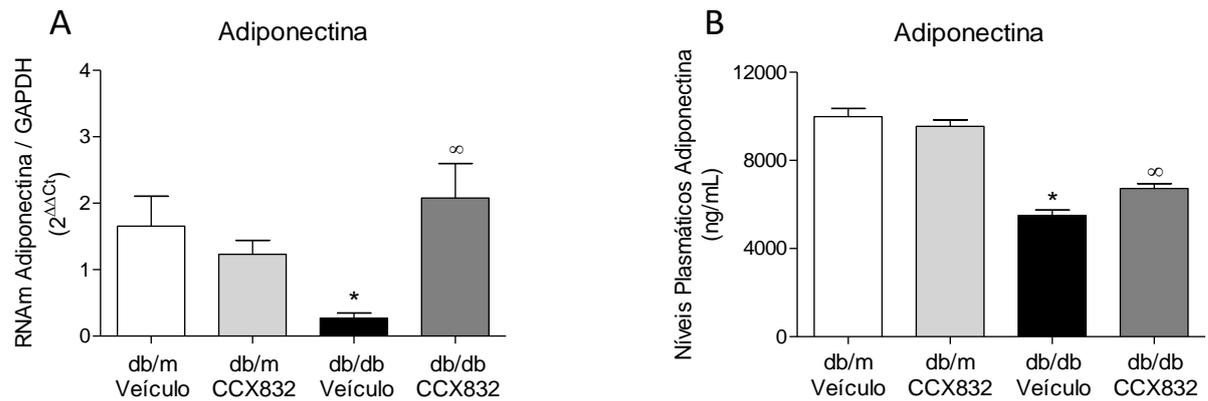


Figura 16. CCX 832 aumenta marcadores anti-inflamatórios no PVAT e plasma de camundongos db/db. (A) Expressão de RNAm de adiponectina avaliada por PCR em tempo real em PVAT de camundongos db/m e db/db tratados com veículo ou CCX 832. (B) Níveis plasmáticos de adiponectina foram avaliados por Elisa. Resultados representam a média \pm E.P.M (n=5-8 para cada grupo). Significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao (*) grupo db/m veículo, (∞) grupo db/db CCX 832. ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni.

Conclusões parciais 2

- *O antagonismo do receptor de chemerin, ChemR23, através do composto CCX 832 diminui a massa corporal de camundongos db/db sem alterar a ingestão alimentar destes animais.*
- *CCX 832 diminui os níveis de insulina e glicose em camundongos db/db, mas não afeta a tolerância à glicose destes animais, sugerindo que chemerin está atuando diretamente apenas nas vias de sinalização ativadas pela insulina.*
- *CCX 832 diminui a massa do baço e reduz marcadores pró-inflamatórios no PVAT de animais db/db, sugerindo que o tratamento melhora o perfil inflamatório destes animais obesos e diabéticos.*
- *O antagonismo de ChemR23 diminui os níveis de creatinina na urina de camundongos db/db, indicando que CCX 832 melhora a função renal destes animais.*
- *CCX 832 diminui a vasoconstrição induzida pela PhE e melhora a vasodilatação induzida pela ACh e insulina em camundongos db/db, mostrando que o antagonismo de ChemR23 atenua a disfunção vascular de camundongos obesos e diabéticos db/db.*
- *CCX 832 não altera as características estruturais das artérias mesentéricas de camundongos db/db.*
- *CCX 832 aumenta a fosforilação de importantes proteínas ativadas pela insulina (IRS-1, PI3K e Akt) em aortas de camundongos db/db, as quais estão prejudicadas em animais db/db tratados com veículo, sugerindo que o antagonismo de ChemR23 melhora a sinalização vascular da insulina em camundongos obesos e diabéticos db/db.*
- *O antagonismo de ChemR23 reduz o estresse oxidativo em aorta e rim de camundongos db/db, efeito que pode estar mediando a melhora na*

sinalização vascular da insulina promovida por CCX 832 em camundongos obesos e diabéticos db/db.

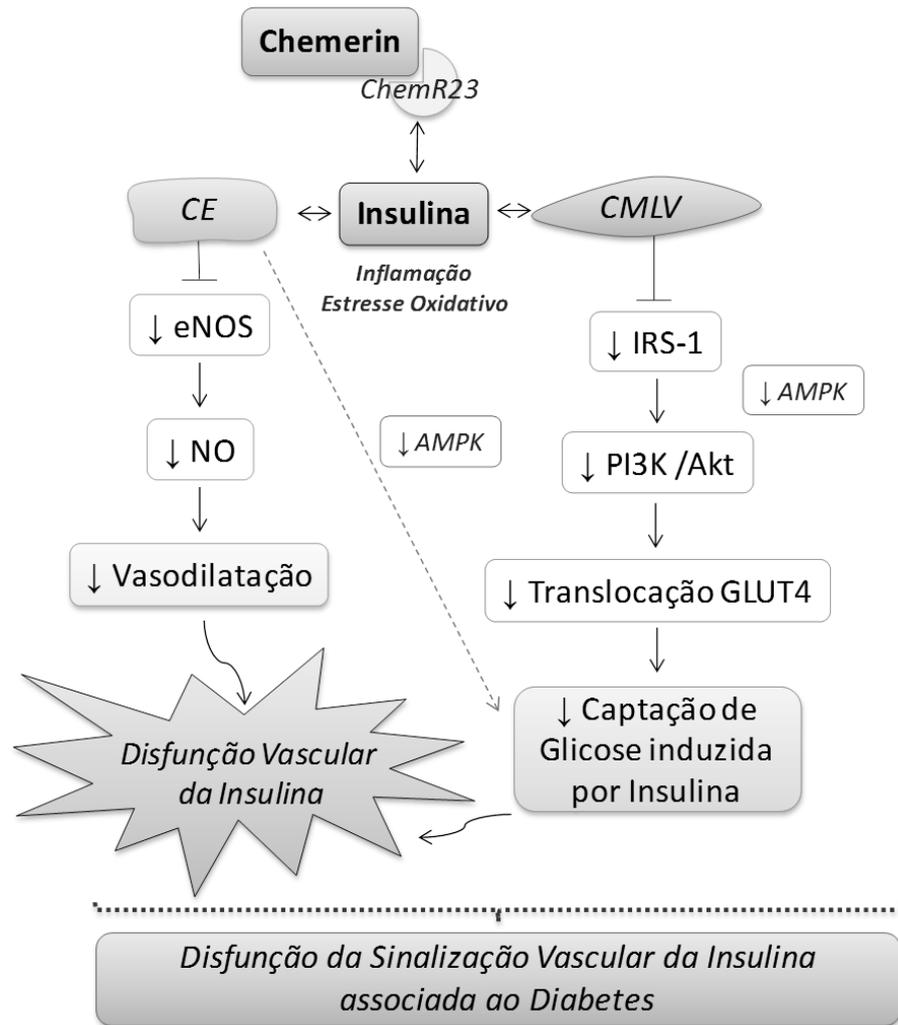


Figura 17. Figura esquemática representando possíveis mecanismos pelos quais o sistema chemerin/ChemR23 modula/compromete efeitos vasculares de insulina. O eixo chemerin/ChemR23 pode levar a alterações na sinalização vascular da insulina, as quais podem ser relacionadas à disfunção vascular e endotelial associada ao diabetes. A interação entre adipócitos e vasculatura pode ser um importante mecanismo de dano vascular subjacente em complicações cardiovasculares relacionadas ao diabetes.

9. Discussão

Nossos resultados demonstram que (1) chemerin atenua a vasodilatação induzida por insulina através de seu próprio receptor, sinalização PI3K/Akt e estresse oxidativo; (2) chemerin diminui a fosforilação da eNOS e a produção de NO em células endoteliais induzida por insulina através da via de sinalização PI3K/Akt e estresse oxidativo; (3) em CMLV, chemerin diminui a sinalização da insulina via ChemR23 e estresse oxidativo; (4) o antagonismo de ChemR23 através de CCX 832 diminui a massa corporal de camundongos db/db; (5) CCX 832 restaura parcialmente a vasodilatação induzida pela insulina diminuída em animais db/db e melhora a sinalização da insulina nos camundongos diabéticos db/db; (6) CCX 832 diminui o perfil inflamatório do PVAT e o estresse oxidativo em vasos e rins de camundongos db/db. Os resultados deste estudo mostram pela primeira vez que o eixo chemerin/ChemR23 desempenha um papel notável no estresse oxidativo e disfunção da sinalização da insulina no diabetes.

Na obesidade, a produção de adipocinas é alterada, promovendo uma inflamação crônica e conduzindo a um aumento dos níveis de adipocinas pró-inflamatórias ¹⁰¹. O aumento das adipocinas pró-inflamatórias pode modificar a sinalização ativada pela insulina. TNF- α e IL-6, por exemplo, são bons indicadores do desenvolvimento do DM2 ¹⁰². TNF- α foi identificado como um regulador de sensibilidade à insulina ¹⁰³. Em adipócitos 3T3-L1, IL-6 reduz a expressão de um dos substratos do receptor da insulina, IRS-1, e do transportador de glicose, GLUT4 ¹⁰⁴. Similarmente, o aumento dos níveis de TNF- α promovem redução da fosforilação de IRS-1 e diminuem a transdução do sinal da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo de ratos obesos ¹⁰⁵. Nesse sentido, nossos dados apontam que chemerin diminui a fosforilação de IRS-1, PI3K e Akt induzida por insulina, bem como reduz a translocação de GLUT4 para a membrana e a captação de glicose também induzidas pela insulina em CMLV de animais não obesos, não diabéticos (C57BL/6J). Os efeitos moleculares da adipocina chemerin na sinalização vascular

da insulina também são refletidos na reatividade vascular à insulina, uma vez que chemerin atenua a vasodilatação induzida por insulina em artérias mesentéricas de camundongos controle, efeito dependente da sinalização de PI3K/Akt e estresse oxidativo. Juntos, esses achados sugerem que chemerin pode ter participação importante na resistência à insulina em CMLV, estando o estresse oxidativo envolvido em seus efeitos, como foi demonstrado por nosso grupo anteriormente ⁸⁵.

Corroborando nossos dados, um estudo recente demonstrou que chemerin diminui a captação de glicose e fosforilação de Akt estimuladas por insulina em cardiomiócitos de ratos. A inibição da MAPK ERK1/2 parcialmente reverte este efeito ⁹². Nesse sentido, Jager *et al.* (2007) demonstraram que a IL-1 β reduz a fosforilação de PI3K/p85 e Akt induzida pela insulina. Do mesmo modo, IL-1 β diminui a expressão das proteínas IRS-1 e Akt em adipócitos, o que culminou em redução significativa da captação de glicose promovida pela insulina ¹⁰⁶. De forma semelhante, a interleucina-17 (IL-17) inibe a captação de glicose *in vitro* em adipócitos 3T3-L1 ¹⁰⁷.

Nosso estudo demonstrou que os níveis plasmáticos de chemerin estão aumentados em camundongos db/db, dado confirmado por diferentes outros estudos ^{65, 108}. Além disso, camundongos db/db tratados com antagonista do receptor de chemerin ChemR23, pelo uso do composto CCX 832, apresentam sutil, mas significativa, redução da massa de tecido adiposo e um decréscimo na massa corporal na terceira semana de tratamento. Possivelmente, se o tratamento se prolongasse, este efeito poderia se mostrar mais acentuado. Complementarmente, já foi demonstrado que chemerin regula a adipogênese por meio de seu próprio receptor ChemR23 ⁴³ e que a expressão de chemerin e seus receptores, ChemR23, CCRL2, e GPR1 é alterada em tecido adiposo branco, músculo esquelético e fígado de camundongos obesos e diabéticos ⁶⁵. No entanto, na literatura, os efeitos da depleção ou inibição de ChemR23 sobre a massa corporal ainda são controversos. Enquanto Rouger *et al.* (2013) não observaram alterações na massa corporal e massa de tecido adiposo em camundongos *knockout* (KO) para ChemR23 ¹⁰⁹, achados de Ernst *et al.* (2012) corroboram nossas observações mostrando que camundongos ChemR23^{-/-} apresentaram redução na massa corporal total e percentual de gordura corporal em comparação com animais controle ⁷³. Interessantemente, este mesmo estudo mostrou diminuição da ingestão alimentar de

animais com deficiência no receptor para chemerin, enquanto nosso estudo não encontrou diferença neste aspecto.

A massa corporal não é o único tema discutível relacionado aos animais em que ChemR23 foi depletado ou antagonizado. Os níveis de glicose e insulina também são aspectos que precisam ser discutidos e cautelosamente compreendidos neste caso. Em nossos achados, camundongos db/db tratados com CCX 832 apresentam diminuição significativa nos níveis de glicose e de insulina plasmática ao final do tratamento, bem como diminuição dos índices glicêmicos a partir da segunda semana de tratamento, dado que reforça o fato de chemerin contribuir para resistência à insulina neste modelo de diabetes. Tem sido demonstrado que chemerin influencia a homeostase da glicose assim como contribui para as desordens metabólicas na obesidade e DM2 ⁶⁵. A administração exógena de chemerin exacerba a intolerância à glicose, reduz os níveis séricos de insulina e a captação de glicose pelos tecidos de camundongos db/db ⁶⁵. Apesar deste estudo reforçar nossas descobertas, Rouger *et al.* (2013) verificaram que a tolerância à glicose não foi afetada em camundongos jovens deficientes em ChemR23 ¹⁰⁹.

Interessantemente, no presente trabalho, quando realizado o teste de tolerância à glicose, camundongos db/db tratados com CCX 832 não apresentam melhora em sua intolerância à glicose. Apesar disto, nos deparamos ao longo deste estudo com importante restabelecimento de outros aspectos chave da sinalização da insulina, como o aumento da expressão das principais vias de sinalização ativadas por insulina, PI3K, Akt e IRS1, bem como atenuação do prejuízo na vasodilatação induzida por insulina em aorta e artérias mesentéricas de animais db/db, respectivamente. Esses achados, juntamente com nossos resultados em CMLV, reforçam a ideia de que chemerin, via ChemR23, possa atuar majoritariamente de forma direta na sinalização vascular da insulina sem, no entanto, alterar a homeostase da glicose nestes animais. Nossos achados são corroborados pelo estudo de Ernst *et al.* (2012), que demonstraram que animais ChemR23^{-/-} submetidos a dieta rica em gordura por 24 semanas são também intolerantes à glicose se comparados aos animais controle ⁷³.

A insulina liga-se especificamente ao seu receptor, um heterotetrâmero composto por duas subunidades α e duas β ¹¹⁰. A ligação da insulina à subunidade α do receptor de insulina promove alteração conformacional que leva a autofosforilação das subunidades β . Uma vez ativado, o receptor induz a fosforilação de resíduos de tirosina dos substratos de receptores da insulina (IRS) ¹¹¹. A fosforilação dos substratos de receptores da insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2) conduz à ativação da via de sinalização PI3K/Akt ^{12, 112, 113}. A relação entre a via PI3K/Akt e metabolismo da glicose já está bem caracterizada ^{13, 114, 115}. Classicamente, a sinalização metabólica da insulina resulta em vasodilatação através de aumento da produção de NO, bem como a insulina modula a produção de prostaglandinas e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio ¹¹⁶. Em nossos resultados, além da redução da vasodilatação induzida por insulina observada em artérias mesentéricas de camundongos não-obesos não-diabéticos através de mecanismos envolvendo a sinalização PI3K/Akt e estresse oxidativo, chemerin também reduz a fosforilação da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) e a produção de NO estimuladas por insulina em células endoteliais, novamente através de estresse oxidativo, o que pode contribuir para explicar a disfunção vascular à insulina associada ao diabetes e obesidade.

Tem sido proposto que a resistência aos efeitos vasculares de insulina envolve seletivamente a via de sinalização da PI3K/Akt/NO ¹¹⁷. Em células endoteliais, o bloqueio da via PI3K induz a resistência à insulina, o que por sua vez, resulta na diminuição da produção de NO ¹¹⁸. Como demonstrado neste estudo, os efeitos de chemerin são principalmente mediados pelo seu receptor ChemR23 e nossos dados sugerem que ele parece ser componente relevante para compreender a diminuição da sensibilidade vascular à insulina em modelo de diabetes associado à obesidade. Aqui, demonstramos que o antagonismo de ChemR23 restaura parcialmente a vasodilatação induzida por insulina em camundongos obesos e diabéticos db/db, bem como aumenta a fosforilação das proteínas PI3K, Akt e IRS-1 prejudicada em vasos destes animais. Em ratos obesos há redução expressiva na fosforilação de resíduos de tirosina do receptor de insulina (IR) e de IRS-1/IRS-2, bem como da ativação de PI3K e Akt na vasculatura ¹¹⁹. Em concordância, ratos espontaneamente hipertensos também exibem resistência à insulina na vasculatura com menor produção de NO estimulada pela insulina associado a uma maior secreção de ET-1 ¹²⁰.

O estresse oxidativo é crucial contribuinte para a etiologia multifatorial da resistência à insulina, particularmente no músculo esquelético ¹²¹⁻¹²³, assim como na disfunção das células β pancreáticas ¹²¹. Existem numerosas desordens celulares e sistêmicas que podem contribuir para o excesso da produção de ERO, incluindo hiperglicemia, dislipidemia, estresse do retículo endoplasmático (ER) e os produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais podem ativar fatores associados à resistência à insulina ¹²⁴. Em humanos, existe associação entre os marcadores séricos de estresse oxidativo e o grau de resistência à insulina ^{125, 126}. Em modelos animais, o estresse oxidativo interrompe a ativação de IRS-1 e PI3K induzida pela insulina e, assim, compromete a translocação de GLUT4 em adipócitos 3T3-L1 ¹²⁷. No tecido adiposo de homens saudáveis submetidos a ingestão calórica excessiva, o estresse oxidativo induz resistência à insulina parcialmente via inativação de GLUT4 devido a carbonilação e oxidação desta proteína ¹²⁸. Sendo assim, o aumento da geração de ERO em aorta e rim de camundongos db/db demonstrada em nosso estudo pode ser associada à redução da sinalização da insulina observada nestes animais. Além disso, o eixo chemerin/ChemR23 parece ter participação neste efeito, uma vez que foi demonstrado que o antagonismo de ChemR23 atenua a produção de ERO em vasos e rim de camundongos db/db assim como restaura a sinalização de insulina em vasos destes animais obesos e diabéticos. Podemos ainda ir mais adiante, pois nossos resultados confirmam o envolvimento do estresse oxidativo no comprometimento da sinalização da insulina induzida por chemerin, uma vez que um antioxidante é capaz de atenuar a redução da fosforilação de Akt e IRS-1, a captação de glicose e vasodilatação induzidas por insulina observadas em CMLV e artérias estimuladas com chemerin.

De modo complementar, este estudo demonstrou que chemerin diminui a fosforilação da AMPK tanto em CE quanto em CMLV. A AMPK é uma quinase de resíduos de serina-treonina considerada mediador importante do metabolismo da glicose ¹²⁹. Neste sentido, o desenvolvimento de medicamentos ativadores de AMPK emergiram como potencial tratamento para o diabetes tipo 2. Está bem estabelecido que, agudamente, a ativação de AMPK estimula a captação de glicose via GLUT1 e GLUT4 no músculo esquelético ¹³⁰. Em cardiomiócitos, a ativação da AMPK aumenta a expressão de GLUT4 de forma dependente da PKC ¹³¹. Além disso, a ativação da AMPK pelo composto 5-amino-4-imidazol-1- β -D-carboxamida

ribofuranosídeo (AICAR) aumenta a captação de glicose no coração e músculo esquelético^{132, 133}. O tratamento crônico com AICAR também aumenta a captação de glicose induzida pela insulina no músculo esquelético de ratos normais¹³⁴, possivelmente, pelo aumento da expressão de GLUT-4¹³⁵, o que pode explicar a prevenção do desenvolvimento de resistência à insulina *in vitro*¹³⁶. De modo importante, aumento na expressão do gene GLUT4 humano protege camundongos db/db de desenvolver resistência à insulina e diabetes¹³⁷. Da mesma forma, nossos resultados mostraram que a ativação de AMPK, por meio do uso de AICAR, (e também a ativação da via PI3K/Akt) reverte os efeitos da adipocina chemerin sobre a captação da glicose induzida pela insulina em CMLV de camundongos controle, o que está de acordo com os dados da fosforilação da AMPK observados neste estudo.

Vale a pena mencionar que há uma interação muito bem estabelecida entre os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e receptores de tirosina quinase (RTKs) com a participação de GPCRs ativando proteínas *upstream* ou *downstream* dos RTKs^{138 139}. ChemR23 é um GPCR reconhecido por atuar através de G_i e ativar várias vias de sinalização intracelulares, como a MAPK ERK1/2⁴⁰. Por outro lado, o receptor de insulina pertence à família dos RTKs, o qual desempenha um papel crítico no desenvolvimento, divisão e metabolismo celular¹⁴⁰. A ativação dos membros da família RTK resulta em autofosforilação e fosforilação de substratos de proteínas seletivas (IRS) exclusivamente em resíduos de tirosina¹⁴¹. Recentemente, vários prováveis mecanismos surgiram para compreender a transativação entre GPCRs e RTKs. Moléculas tais como PKC, Src e ERO podem mediar a transativação de RTKs. Outras proteínas adaptadoras como Gab1 (*GRB2-Associated Binding Protein 1*), IRS-1 e GIT1 (proteína adaptadora multifuncional acoplada à proteína G) também têm sido consideradas mediadores da transativação de RTKs induzida por ligantes de GPCRs. Adicionalmente, recentemente, a ativação de fosfatases de proteínas tirosina em resposta à ativação de GPCRs também tem sido apontada como possível mecanismo do *crosstalk* entre GPCRs e RTKs¹⁴². Neste estudo foi demonstrado que chemerin, através de ChemR23, modula a fosforilação do IRS-1 e a ativação da cascata subsequente. Recentemente, foi demonstrado que chemerin estimula a migração de células do estroma mesenquimal derivadas da medula óssea através de p42/44, p38 e JNK-II MAPKs de modo

dependente de PKC ¹⁴³. Entretanto, não foi esclarecido neste estudo como ChemR23 e IR/IRS estão se comunicando. Assim, estudos mais aprofundados são necessários para entender e dissecar específicas proteínas mediando tal interação.

No presente estudo, demonstramos ainda que artérias mesentéricas de camundongos db/db apresentam disfunção vascular, bem como anormalidades nos parâmetros estruturais de suas artérias. Remodelamento hipertrófico externo, que é caracterizado pelo aumento concomitante de diâmetro interno e externo e aumento da área de secção transversa (AST) e espessura da parede, foi encontrado em camundongos db/db. Souza-Smith *et al.* (2011) relataram remodelamento hipertrófico externo em artérias mesentéricas de camundongos db/db ⁹⁷. Por outro lado, Katz *et al.* (2011) verificaram remodelamento hipertrófico interno em artérias coronárias de camundongos db/db, o que foi associado com redução da rigidez da parede da artéria coronária ¹⁴⁴. Essas diferenças nos processos de remodelamento vascular possivelmente são derivadas de variados graus de sensibilidade à insulina, obesidade e/ou exposição crônica a hiperglicemia ⁹⁷. Independentemente do tipo de remodelamento, é importante notar que mudanças na estrutura vascular aumentam o risco de eventos cardiovasculares adversos e indicam prognóstico desfavorável no DM2 ⁸¹. Os animais db/db submetidos ao tratamento com CCX 832, entretanto, não apresentaram nenhuma melhora em suas propriedades estruturais vasculares. É possível que um período mais prolongado de tratamento seja capaz de melhorar estas respostas.

Com relação à disfunção vascular observada em artérias mesentéricas de camundongos db/db, nossos resultados mostraram aumento da vasoconstrição induzida por PhE e diminuição da vasodilatação induzida por ACh e insulina nestes animais, sugerindo disfunção vascular relacionada a alterações da função da musculatura lisa e das células endoteliais nesses animais. Curiosamente, o tratamento com CCX 832 atenua a disfunção vascular em camundongos db/db. Nesse sentido, um estudo recente descreveu também maior contração para chemerin-9, um agonista de ChemR23, em artérias mesentéricas de animais e seres humanos obesos e o antagonismo de ChemR23 reduz este efeito potencializador ⁴⁹, confirmando a participação do sistema chemerin/ChemR23 nas alterações vasculares observadas em condições patológicas como obesidade e diabetes.

A relação entre adiposidade e resistência à insulina como determinantes do desenvolvimento da disfunção vascular já foi demonstrado. Por conseguinte, a perda de peso é acompanhada por melhora da sensibilidade à insulina e também da biodisponibilidade endotelial de NO ¹⁴⁵. Nossos achados seguem essa linha de raciocínio, pois animais db/db tratados com CCX 832 apresentaram uma redução da massa corporal, fato que poderia estar relacionado à melhora da resposta vascular à ACh e insulina observada nestes animais. Outro dado deste estudo reforça esta ideia, uma vez que o antagonismo de ChemR23 também aumenta os níveis de NO em células endoteliais. Na verdade, a disfunção endotelial no DM já foi amplamente descrita e pode ser originária de fatores relacionados à doença, tais como hiperglicemia, resistência à insulina e estresse oxidativo ¹⁴⁶. Possivelmente, a melhora na função vascular observada em animais db/db após tratamento com CCX 832 esteja relacionada à redução da geração de ERO, uma vez que este tratamento reduz o estresse oxidativo em vasos e rins de animais db/db bem como, em estudo anterior, demonstramos que os efeitos de chemerin tem participação substancial do estresse oxidativo ¹⁴⁷. Além disso, neste estudo verificamos que um antioxidante reverte os danos vasculares presentes em vasos incubados com chemerin.

Estudos em humanos demonstraram forte correlação entre os níveis circulantes de chemerin e marcadores de inflamação e síndrome metabólica ^{67, 72, 148, 73, 75, 59}. Camundongos deficientes em ChemR23 e tratados com dieta rica em gordura (HFD) por 20 semanas apresentam diminuição dos níveis circulantes e expressão da adipocina pró-inflamatória TNF- α no tecido adiposo se comparados a camundongos controle ⁷³. Do mesmo modo, nosso estudo mostrou que o antagonismo de ChemR23 diminui os níveis de RNAm de duas adipocinas pró-inflamatórias, MCP-1 e TNF- α , no PVAT de camundongos db/db, bem como aumenta os níveis plasmáticos e de RNAm da adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, em animais db/db em comparação a animais db/db tratados com veículo. A redução dos níveis de adiponectina já foi reconhecida, juntamente com a obesidade, como importante marcador da patogênese da resistência à insulina ¹⁴⁹. Consistente com nossos dados, Ernst e colaboradores (2012) observaram também significativa redução dos níveis de RNAm de IL-6 e TNF- α no fígado e tecido adiposo branco de camundongos ChemR23^{-/-} ⁷³.

A relação da via PI3K/Akt e o metabolismo de glicose já se encontra bem caracterizada e é bem estabelecido que a fosforilação de IRS1 e IRS2 pelo receptor de insulina leva a ativação da via PI3K/Akt.^{13, 114, 115}. Esta via pode ser regulada negativamente por fosfatases bem como pela ativação de c-Jun N-terminal quinase (JNK) por citocinas pró-inflamatórias, promovendo a regulação negativa desta via através da fosforilação do resíduo de serina 307 do IRS-1¹⁵⁰⁻¹⁵². Sendo assim, aumento de adipocinas pró-inflamatórias é capaz de modificar a sinalização ativada pela insulina e pode estar relacionado ao desenvolvimento da resistência à insulina observada no diabetes. Em adipócitos 3T3-L1 por exemplo, a IL-6 diminui a expressão do receptor de insulina, IRS-1 e GLUT4¹⁰⁴ e TNF- α diminui a fosforilação de IRS-1 no músculo esquelético e tecido adiposo de ratos obesos¹⁰⁵. Estes estudos podem nos ajudar a compreender nossos achados, sugerindo que a redução de adipocinas pró-inflamatórias e o aumento de anti-inflamatórias em animais db/db tratados com CCX 832 possam estar relacionados de alguma maneira na melhora das respostas vasculares à insulina observada nestes animais.

A massa renal é um parâmetro importante para avaliação de hipertrofia renal. Seu aumento pode indicar maior síntese de proteínas e/ou reduzida degradação dos componentes da matriz extracelular¹⁵³. Portanto, a similaridade apresentada entre os grupos experimentais db/m veículo e db/m CCX 832, indica que esta droga não afeta a função renal dos animais controle. No entanto, animais db/db apresentam aumento da massa dos rins, um efeito sutilmente reduzido pelo tratamento com CCX 832. Para avaliação da função renal também são comumente utilizados os níveis de creatinina. A creatinina é um produto da degradação muscular constante da creatina, uma reação que gera energia necessária à contração muscular. Sua quantidade na urina depende da filtração glomerular e excreção tubular ativa¹⁵⁴. Pelos dados obtidos neste estudo, observa-se que a creatinina urinária foi maior no grupo de animais db/db, sendo reduzida após o tratamento com CCX 832, dado que vai ao encontro dos valores da massa renal. Mediante à compreensão dos parâmetros renais e urinários avaliados, sugere-se que os camundongos db/db utilizados neste estudo apresentam lesões renais, as quais possivelmente estão sendo atenuadas com o antagonismo de ChemR23. Entretanto, estudos mais aprofundados neste sentido são ainda necessários a fim de confirmar tais efeitos e investigar quais os

mecanismos utilizados por chemerin para modular a função renal de camundongos obesos e diabéticos db/db .

6. Conclusões

Em conclusão, através deste estudo fornecemos, experimentalmente *in vitro* e *in vivo*, evidências de que o sistema chemerin/ChemR23 desempenha papel crucial no perfil inflamatório do PVAT, na redução da sinalização vascular de insulina e estresse oxidativo vascular no diabetes, sugerindo seu envolvimento na patogênese da resistência à insulina vascular. Nosso estudo pode contribuir para dissecar ainda mais o papel do eixo chemerin/ChemR23 sobre a disfunção da sinalização da insulina no diabetes e doenças associadas à obesidade. Estudos adicionais são necessários para complementar este campo e contribuir para melhor entendimento do papel dos fatores liberados pelo tecido adiposo sobre a disfunção vascular e resistência à insulina associada. Uma compreensão mais aprofundada desses mecanismos pode fornecer novas percepções sobre o papel do sistema chemerin/ChemR23 na disfunção vascular da insulina associada ao diabetes e à obesidade e, potencialmente torná-lo um promissor candidato a alvo terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas.

Referências Bibliográficas

1. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *The New England journal of medicine*. 2001;345:1345-1346
2. Kougas P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: Implication of vascular disease. *J Surg Res*. 2005;126:121-129
3. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. [the adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50:216-229
4. Yamawaki H. Vascular effects of novel adipocytokines: Focus on vascular contractility and inflammatory responses. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:307-310
5. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: Adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *Journal of lipid research*. 2007;48:1253-1262
6. Matsuzawa Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. 2005;19:637-647
7. Matsuzawa Y. Therapy insight: Adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3:35-42
8. Dulloo AG, Jacquet J, Solinas G, Montani JP, Schutz Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *International journal of obesity*. 2010;34 Suppl 2:S4-17
9. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:19-39
10. Fulton DJ. Mechanisms of vascular insulin resistance: A substitute akt? *Circulation research*. 2009;104:1035-1037

11. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine reviews*. 2007;28:463-491
12. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806
13. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2006;7:85-96
14. Panteli K, Bai M, Hatzimichael E, Zagorianakou N, Agnantis NJ, Bourantas K. Serum levels, and bone marrow immunohistochemical expression of, vascular endothelial growth factor in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Hematology*. 2007;12:481-486
15. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2004;286:H1597-1602
16. Bender SB, McGraw AP, Jaffe IZ, Sowers JR. Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: An early contributor to diabetes-related vascular disease? *Diabetes*. 2013;62:313-319
17. Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:1794-1799
18. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese zucker (fa/fa) rats. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104:447-457
19. Ray LB, Sturgill TW. Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3t3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84:1502-1506
20. Sasaoka T, Rose DW, Jhun BH, Saltiel AR, Draznin B, Olefsky JM. Evidence for a functional role of shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:13689-13694

21. White MF. Irs proteins and the common path to diabetes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2002;283:E413-422
22. Jiang ZY, Zhou QL, Chatterjee A, Feener EP, Myers MG, Jr., White MF, King GL. Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48:1120-1130
23. Book CB, Dunaif A. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84:3110-3116
24. Eringa EC, Stehouwer CD, Roos MH, Westerhof N, Sipkema P. Selective resistance to vasoactive effects of insulin in muscle resistance arteries of obese zucker (fa/fa) rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007;293:E1134-1139
25. Katakam PV, Tulbert CD, Snipes JA, Erdos B, Miller AW, Busija DW. Impaired insulin-induced vasodilation in small coronary arteries of zucker obese rats is mediated by reactive oxygen species. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2005;288:H854-860
26. Oltman CL, Richou LL, Davidson EP, Coppey LJ, Lund DD, Yorek MA. Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in zucker obese and zucker diabetic fatty rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2006;291:H1780-1787
27. Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C, Gao F. Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: Role of pi3-kinase/akt/enos signaling. *European journal of pharmacology*. 2010;628:140-147
28. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: A 26-year follow-up of participants in the framingham heart study. *Circulation*. 1983;67:968-977
29. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking tnf-alpha function. *Nature*. 1997;389:610-614

30. Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT, Henry RR, Kern PA. The expression of tnf alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97:1111-1116
31. Nakamura M, Yoshida H, Arakawa N, Saitoh S, Satoh M, Hiramori K. Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000;36:487-492
32. White LR, Juul R, Skaanes KO, Aasly J. Cytokine enhancement of endothelin et(b) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *European journal of pharmacology*. 2000;406:117-122
33. De Salvatore G, De Salvia MA, Piepoli AL, Natale L, Porro C, Nacci C, Mitolo CI, Mitolo-Chieppa D. Effects of in vivo treatment with interleukins 1beta and 6 on rat mesenteric vascular bed reactivity. *Autonomic & autacoid pharmacology*. 2003;23:125-131
34. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. 1996;348:159-161
35. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*. 1996;334:292-295
36. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:4637-4641
37. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3t3-l1 adipocytes: A possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer research*. 1992;52:4113-4116
38. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of il-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6:315-325

39. Jimenez-Altayo F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;316:42-52
40. Wittamer V, Franssen JD, Vulcano M, Mirjolet JF, Le Poul E, Migeotte I, Brezillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198:977-985
41. Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2007;148:4687-4694
42. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:28175-28188
43. Roh SG, Song SH, Choi KC, Katoh K, Wittamer V, Parmentier M, Sasaki S. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;362:1013-1018
44. Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, Kitazawa R, Fujimoto W, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kiyonari H, Abe T, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K, Takahashi Y. Chemerin regulates beta-cell function in mice. *Scientific reports*. 2011;1:123
45. Du XY, Zabel BA, Myles T, Allen SJ, Handel TM, Lee PP, Butcher EC, Leung LL. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase n, carboxypeptidase b (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:751-758
46. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, Franssen JD, de Nadai P, Huaux F, Parmentier M. Mouse chemr23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model. *J Immunol*. 2009;183:6489-6499

47. Ernst MC, Sinal CJ. Chemerin: At the crossroads of inflammation and obesity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21:660-667
48. Wittamer V, Gregoire F, Robberecht P, Vassart G, Communi D, Parmentier M. The c-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:9956-9962
49. Watts SW, Dorrance AM, Penfold ME, Rourke JL, Sinal CJ, Seitz B, Sullivan TJ, Charvat TT, Thompson JM, Burnett R, Fink GD. Chemerin connects fat to arterial contraction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:1320-1328
50. Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee KJ. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:64-69
51. Zabel BA, Nakae S, Zuniga L, Kim JY, Ohyama T, Alt C, Pan J, Suto H, Soler D, Allen SJ, Handel TM, Song CH, Galli SJ, Butcher EC. Mast cell-expressed orphan receptor ccr12 binds chemerin and is required for optimal induction of ige-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205:2207-2220
52. Kutzleb C, Busmann A, Wendland M, Maronde E. Discovery of novel regulatory peptides by reverse pharmacology: Spotlight on chemerin and the rf-amide peptides metastin and qrfp. *Current protein & peptide science*. 2005;6:265-278
53. Sell H, Laurencikiene J, Taube A, Eckardt K, Cramer A, Horrighs A, Arner P, Eckel J. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2009;58:2731-2740
54. Sell H, Eckel J. Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: In vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? *Proc Nutr Soc*. 2009;68:378-384
55. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, Mahaney MC, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, Collier G, Blangero J, Walder K, Jowett JB. Chemerin is associated with metabolic

- syndrome phenotypes in a mexican-american population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94:3085-3088
56. MacDougald OA, Burant CF. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell metabolism*. 2007;6:159-161
 57. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol*. 2005;174:244-251
 58. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of nk and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 2007;109:3625-3632
 59. Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, Papadaki HH. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: Differential expression and relation to atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:115-130
 60. Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Identification of chemerin receptor (chemr23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;391:1762-1768
 61. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*. 2008;14:741-751
 62. Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JP, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MB, Greaves DR. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through chemr23. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205:767-775
 63. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3t3-l1 adipocytes. *FEBS letters*. 2008;582:573-578
 64. Jialal I, Devaraj S, Kaur H, Adams-Huet B, Bremer AA. Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98:E514-517

65. Ernst MC, Issa M, Goralski KB, Sinal CJ. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2010;151:1998-2007
66. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*. 2010;151:2590-2602
67. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, Farkas S, Scherer MN, Schaffler A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72:342-348
68. Yamamoto T, Qureshi AR, Anderstam B, Heimbürger O, Barany P, Lindholm B, Stenvinkel P, Axelsson J. Clinical importance of an elevated circulating chemerin level in incident dialysis patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010;25:4017-4023
69. Adrych K, Stojek M, Smoczynski M, Sledzinski T, Sylwia SW, Swierczynski J. Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2012;44:393-397
70. Kukla M, Zwirska-Korczala K, Gabriel A, Waluga M, Warakomska I, Szczygiel B, Berdowska A, Mazur W, Wozniak-Grygiel E, Kryczka W. Chemerin, vaspin and insulin resistance in chronic hepatitis c. *J Viral Hepat*. 2010;17:661-667
71. Yilmaz Y, Yonal O, Kurt R, Alahdab YO, Eren F, Ozdogan O, Celikel CA, Imeryuz N, Kalayci C, Avsar E. Serum levels of omentin, chemerin and adiponin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2011;46:91-97
72. Lehrke M, Becker A, Greif M, Stark R, Laubender RP, von Ziegler F, Lebherz C, Tittus J, Reiser M, Becker C, Goke B, Leber AW, Parhofer KG, Broedl UC. Chemerin is associated with markers of inflammation and components of the metabolic syndrome but does not predict coronary atherosclerosis. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2009;161:339-344

73. Ernst MC, Haidl ID, Zuniga LA, Dranse HJ, Rourke JL, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (cmklr1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. *Endocrinology*. 2012;153:672-682
74. Sell H, Divoux A, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Bedossa P, Tordjman J, Eckel J, Clement K. Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95:2892-2896
75. Gao X, Mi S, Zhang F, Gong F, Lai Y, Gao F, Zhang X, Wang L, Tao H. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovascular diabetology*. 2011;10:87
76. Hah YJ, Kim NK, Kim MK, Kim HS, Hur SH, Yoon HJ, Kim YN, Park KG. Relationship between chemerin levels and cardiometabolic parameters and degree of coronary stenosis in Korean patients with coronary artery disease. *Diabetes & metabolism journal*. 2011;35:248-254
77. Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1999;34:795-808
78. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: Effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine*. 2012;2012:918267
79. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular health and risk management*. 2007;3:853-876
80. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *Journal of biomarkers*. 2013;2013:378790
81. Spinetti G, Kraenkel N, Emanuelli C, Madeddu P. Diabetes and vessel wall remodelling: From mechanistic insights to regenerative therapies. *Cardiovascular research*. 2008;78:265-273

82. Pfau D, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function. *Diabetes care*. 2010;33:171-173
83. Yu QX, Zhang H, Xu WH, Hao F, Liu SL, Bai MM, Mu JW, Zhang HJ. Effect of irbesartan on chemerin in the renal tissues of diabetic rats. *Kidney & blood pressure research*. 2015;40:467-477
84. Lobato NS, Neves KB, Filgueira FP, Fortes ZB, Carvalho MH, Webb RC, Oliveira AM, Tostes RC. The adipokine chemerin augments vascular reactivity to contractile stimuli via activation of the mek-erk1/2 pathway. *Life sciences*. 2012;91:600-606
85. Neves KB, Lobato NS, Lopes RA, Filgueira FP, Zanotto CZ, Oliveira AM, Tostes RC. Chemerin reduces vascular nitric oxide/cgmp signalling in rat aorta: A link to vascular dysfunction in obesity? *Clinical science*. 2014;127:111-122
86. Horn P, Metzger UB, Steidl R, Romeike B, Rauchfuss F, Sponholz C, Thomas-Ruddel D, Ludewig K, Birkenfeld AL, Settmacher U, Bauer M, Claus RA, von Loeffelholz C. Chemerin in peritoneal sepsis and its associations with glucose metabolism and prognosis: A translational cross-sectional study. *Critical care*. 2016;20:39
87. Dogan SB, Balli U, Dede FO, Sertoglu E, Tazegul K. Chemerin as a novel crevicular fluid marker of periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of periodontology*. 2016:1-18
88. Zhuang XH, Sun FD, Chen SH, Liu YT, Liu W, Li XB, Pan Z, Lou NJ. Circulating chemerin levels are increased in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Clinical laboratory*. 2014;60:983-988
89. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regulatory peptides*. 2009;154:102-106
90. Zhuang X, Sun F, Li L, Jiang D, Li X, Sun A, Pan Z, Lou N, Zhang L, Lou F. Therapeutic effect of metformin on chemerin in non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease (nafld). *Clinical laboratory*. 2015;61:1409-1414
91. Huang Z, Xie X. [chemerin induces insulin resistance in c2c12 cells through nuclear factor-kappab pathway-mediated inflammatory reaction]. *Xi bao yu fen*

zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2015;31:725-729

92. Zhang R, Liu S, Guo B, Chang L, Li Y. Chemerin induces insulin resistance in rat cardiomyocytes in part through the erk1/2 signaling pathway. *Pharmacology.* 2014;94:259-264
93. Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC, 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K, Amdcc. Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2005;16:27-45
94. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research.* 1977;41:19-26
95. Briones AM, Rodriguez-Criado N, Hernanz R, Garcia-Redondo AB, Rodrigues-Diez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents angiotensin ii-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension.* 2009;54:142-149
96. Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, Gonzalez MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaices M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* 2006;291:H193-201
97. Souza-Smith FM, Katz PS, Trask AJ, Stewart JA, Jr., Lord KC, Varner KJ, Vassallo DV, Lucchesi PA. Mesenteric resistance arteries in type 2 diabetic db/db mice undergo outward remodeling. *PloS one.* 2011;6:e23337
98. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 1976;72:248-254
99. Bonventre PF, Straus D, Baughn RE, Imhoff J. Enhancement of carrier-mediated transport after immunologic activation of peritoneal macrophages. *Journal of immunology.* 1977;118:1827-1835
100. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis.* 1986;7:1849-1851

101. Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: Linking immune responses to metabolic stress. *Febs J.* 2009;276:5747-5754
102. Fain JN, Bahouth SW, Madan AK. Tnfalpha release by the nonfat cells of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2004;28:616-622
103. Sell H, Dietze-Schroeder D, Eckel J. The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006;17:416-422
104. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (il-6) induces insulin resistance in 3t3-l1 adipocytes and is, like il-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:45777-45784
105. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. Irs-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tnf-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science.* 1996;271:665-668
106. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007;148:241-251
107. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC. Il-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *Journal of immunology.* 2010;185:6947-6959
108. Wargent ET, Zaibi MS, O'Dowd JF, Cawthorne MA, Wang SJ, Arch JR, Stocker CJ. Evidence from studies in rodents and in isolated adipocytes that agonists of the chemerin receptor cmklr1 may be beneficial in the treatment of type 2 diabetes. *PeerJ.* 2015;3:e753
109. Rouger L, Denis GR, Luangsay S, Parmentier M. Chemr23 knockout mice display mild obesity but no deficit in adipocyte differentiation. *The Journal of endocrinology.* 2013;219:279-289
110. Jacobs S, Cuatrecasas P. Insulin receptor: Structure and function. *Endocrine reviews.* 1981;2:251-263

111. Kanzaki M. Insulin receptor signals regulating glut4 translocation and actin dynamics. *Endocr J.* 2006;53:267-293
112. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of irs proteins, insulin action, and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism.* 2009;296:E581-591
113. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* 2002;12:65-71
114. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296:1655-1657
115. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: Molecular targets of insulin resistance. *The Journal of clinical investigation.* 2000;106:165-169
116. Muniyappa R, Yavuz S. Metabolic actions of angiotensin ii and insulin: A microvascular endothelial balancing act. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;378:59-69
117. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2013;14:5-12
118. Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002;277:1794-1799
119. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese zucker (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest.* 1999;104:447-457
120. Potenza MA, Marasciulo FL, Chieppa DM, Brigiani GS, Formoso G, Quon MJ, Montagnani M. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats is associated with endothelial dysfunction characterized by imbalance between no and et-1 production. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005;289:H813-822

121. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine reviews*. 2002;23:599-622
122. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52:1-8
123. Henriksen EJ. Exercise training and the antioxidant alpha-lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free radical biology & medicine*. 2006;40:3-12
124. Solinas G, Karin M. Jnk1 and ikkbeta: Molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *Faseb J*. 2010;24:2596-2611
125. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type ii) diabetic patients. *Metabolism*. 1994;43:1426-1429
126. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in niddm. *Diabetologia*. 1997;40:647-653
127. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3t3-l1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase b activation and glut4 translocation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:10595-10602
128. Boden G, Homko C, Barrero CA, Stein TP, Chen X, Cheung P, Fecchio C, Koller S, Merali S. Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, glut4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. *Sci. Transl. Med*. 2015;7:304re307
129. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-amp-activated protein kinase (ampk) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem. J*. 2003;375:1-16

130. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' amp-activated protein kinase activation causes glut4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999;48:1667-1671
131. Nishino Y, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ikeda Y, Kobayashi H, Shimamoto K. Ischemic preconditioning activates ampk in a pkc-dependent manner and induces glut4 up-regulation in the late phase of cardioprotection. *Cardiovasc. Res*. 2004;61:610-619
132. Russell RR, 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial glut-4 and increased glucose uptake through activation of ampk by aicar. *Am. J. Physiol*. 1999;277:H643-649
133. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. Aica riboside increases amp-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am. J. Physiol*. 1997;273:E1107-1112
134. Buhl ES, Jessen N, Schmitz O, Pedersen SB, Pedersen O, Holman GD, Lund S. Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and glut4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes*. 2001;50:12-17
135. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-amp-activated protein kinase increases glut-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 1999;87:1990-1995
136. Kawanaka K, Han DH, Gao J, Nolte LA, Holloszy JO. Development of glucose-induced insulin resistance in muscle requires protein synthesis. *J. Biol. Chem*. 2001;276:20101-20107
137. Brozinick JT, Jr., McCoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, Cushman SW, Gibbs EM. Glut4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a lifelong cure. *Diabetes*. 2001;50:593-600
138. Lowes VL, Ip NY, Wong YH. Integration of signals from receptor tyrosine kinases and g protein-coupled receptors. *Neuro-Signals*. 2002;11:5-19

139. Waters C, Pyne S, Pyne NJ. The role of g-protein coupled receptors and associated proteins in receptor tyrosine kinase signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004;15:309-323
140. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1993;62:453-481
141. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: Structure, function, and signaling. *Am. J. Physiol.* 1994;266:C319-334
142. Natarajan K, Berk BC. Crosstalk coregulation mechanisms of g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Methods Mol. Biol.* 2006;332:51-77
143. Kumar JD, Holmberg C, Kandola S, Steele I, Hegyi P, Tiszlavicz L, Jenkins R, Beynon RJ, Peeney D, Giger OT, Alqahtani A, Wang TC, Charvat TT, Penfold M, Dockray GJ, Varro A. Increased expression of chemerin in squamous esophageal cancer myofibroblasts and role in recruitment of mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2014;9:e104877
144. Katz PS, Trask AJ, Souza-Smith FM, Hutchinson KR, Galantowicz ML, Lord KC, Stewart JA, Jr., Cismowski MJ, Varner KJ, Lucchesi PA. Coronary arterioles in type 2 diabetic (db/db) mice undergo a distinct pattern of remodeling associated with decreased vessel stiffness. *Basic research in cardiology.* 2011;106:1123-1134
145. Pierce GL, Beske SD, Lawson BR, Southall KL, Benay FJ, Donato AJ, Seals DR. Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults. *Hypertension.* 2008;52:72-79
146. Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research.* 2013;10:472-482
147. Neves KB, Nguyen Dinh Cat A, Lopes RA, Rios FJ, Anagnostopoulou A, Lobato NS, de Oliveira AM, Tostes RC, Montezano AC, Touyz RM. Chemerin regulates crosstalk between adipocytes and vascular cells through nox. *Hypertension.* 2015;66:657-666

148. Dong B, Ji W, Zhang Y. Elevated serum chemerin levels are associated with the presence of coronary artery disease in patients with metabolic syndrome. *Intern Med.* 2011;50:1093-1097
149. Bilir BE, Guldiken S, Tuncbilek N, Demir AM, Polat A, Bilir B. The effects of fat distribution and some adipokines on insulin resistance. *Endokrynologia Polska.* 2016
150. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277:1531-1537
151. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for jnk in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420:333-336
152. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. C-jun n-terminal kinase (jnk) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278:2896-2902
153. Lima DX, Petroianu A, Rodrigues KC, Salles PG. [effect of cholestasis on renal morphological and functional aspects after nephrectomy]. *Revista da Associacao Medica Brasileira.* 2008;54:513-516
154. Ryan D, Robards K, Prenzler PD, Kendall M. Recent and potential developments in the analysis of urine: A review. *Analytica chimica acta.* 2011;684:8-20

8. Anexo A – Certificado dos Princípios Éticos na Experimentação Animal.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 Campus de Ribeirão Preto
 Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1593.53.0), intitulado "Efeitos da Adipocina Chemerin sobre a Responsividade à Insulina de Artérias Mesentéricas de Camundongos", de autoria de **Karla Bianca Neves** e de **Ana Maria de Oliveira**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Câmpus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.12.2012.

Colaboradores: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia;
 Carla Pavan;
 Fabíola Mestriner

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1593.53.0), entitled: "Effects of the Adipokine Chemerin on the Responsiveness to Insulin Mesenteric Arteries of Mice", by **Karla Bianca Neves** and **Ana Maria de Oliveira**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December, 10 2012.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2012.

Presidente da CEUA
 Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro

