Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Efeito da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular:
análise em aortas de rato**

Karla Bianca Neves

Ribeirão Preto

2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Efeito da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular:
análise em aortas de rato**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências
Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Karla Bianca Neves

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

Ribeirão Preto

2012

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

Efeito da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular: análise em aorta de ratos. Ribeirão Preto, 2012. 98 p., 30 cm.

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

Orientadora: Oliveira, Ana Maria de.

1. Adipocina Chemerin. 2. Tecido adiposo branco. 3. Reatividade vascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Karla Bianca Neves

Título: Efeito da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular: análise em aorta de ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre 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: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A meus pais, Carlos e Júlia, minhas irmãs, Stela, Márcia e Kitty,
e minha sobrinha amada, 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.

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 riso e alegria à minha vida. Vocês são preciosos!

Ao amado 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.

À profa. Dra Ana Maria de Oliveira, pela orientação no desenvolvimento deste projeto, por todo apoio, confiança e amizade (mesmo com meu início complicado e turbulento). Seus ensinamentos contribuíram imensamente para meu crescimento intelectual e pessoal.

À profa. Dra. Rita Tostes, pela oportunidade, o apoio, seja qual fossem as circunstâncias, acolhimento e orientação. Sou grata pela convivência com um ser tão “humano”.

À profa. Dra. Núbia Lobato, pelas preciosas e fundamentais ideias, amizade e orientação essencial durante todas as etapas deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas valiosas sugestões e pela disponibilidade.

À profa. Dra. Maria Cristina Salgado de Oliveira, seu técnico, Orlando Mesquita, e à pós-doutoranda Christiane Becari, responsáveis pelos meus primeiros ensinamentos, agradeço pela disponibilidade e “empréstimo” de seu laboratório.

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

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

À Eleni e Rose, secretárias da pós-graduação da FCFRP – USP, pelo apoio em todos os sentidos, principalmente pela solidariedade em um dos momentos mais difíceis dentro da minha caminhada.

Aos amigos do laboratório da Dra. Rita Tostes (minha 2ª família): Zidonia, Fernando, Camila, Thiago, Marcondes, Fernanda, Victor, Fernanda Giachini, Stêfany, Carla, Fabíola e Maria, pela colaboração, cumplicidade, ensinamento e agradável convívio.

Aos amigos da Farmacologia: Alejandro Prado, Alisson Martins, Carla Speroni, Junya de Lacorte, Laena Pernomian, Leandro Antero e Sara Hott, pela amizade, incentivo, pelos sorrisos e bons momentos compartilhados durante estes anos em Ribeirão Preto.

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 apoio financeiro da FAPESP (processo: 2010/02434-0), CNPq e CAPES.

*“Dê a todos os seus ouvidos, mas a poucos sua voz
(William Shakespeare)*

...

*Ouçá bastante, para falar o suficiente
(Raimundo Soares)”.*

RESUMO

NEVES, KB. **Efeito da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular: análise em aorta de ratos**. 2012. 98 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Embora seja na obesidade onde se observa hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e aumento da síntese e liberação de adipocinas, condição associada com resistência à insulina e disfunção endotelial, é de suma importância entender os efeitos biológicos de adipocinas, mais especificamente da adipocina chemerin, em condições não patológicas. Os mecanismos pelos quais as citocinas liberadas pelo tecido adiposo podem interferir na função vascular ainda não estão totalmente esclarecidos. Além disso, praticamente não se conhecem os efeitos da citocina/adipocina chemerin sobre a função vascular. Levando-se em consideração que o receptor para chemerin está presente no músculo liso vascular e no endotélio, este trabalho avaliou a atividade biológica e celular desta adipocina sobre a vasculatura de animais não obesos. Investigou-se os efeitos produzidos por esta citocina na reatividade vascular, bem como os mecanismos pelos quais ela modifica a função vascular em animais não obesos. A hipótese deste trabalho é que chemerin aumenta a reatividade vascular a estímulos constritores de endotelina-1 (ET-1) e fenilefrina (PhE) e diminui a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS). Nossos objetivos específicos incluíam determinar: 1) se chemerin promove alterações na reatividade vascular; 2) se as alterações de reatividade vascular promovidas por chemerin são mediadas por modificações da função das células endoteliais ou células de músculo liso vascular; 3) quais vias de sinalização (foco na via das MAPKs) estão sendo modificadas por chemerin e como elas contribuem para as alterações de reatividade vascular produzidas por esta citocina. Nosso estudo demonstrou que a adipocina chemerin possui atividade biológica e celular em aortas de ratos não obesos. Chemerin aumentou respostas vasculares a estímulos contráteis (ET-1 e PhE), atuando tanto no endotélio quanto diretamente em células do músculo liso vascular. O aumento da resposta a estímulos contráteis à ET-1 e PhE foi mediado pela via MEK-ERK1/2, COX-1 e COX-2 e aumento da expressão dos receptores para ET-1, ETA e ETB. Além disso, esta adipocina diminuiu a vasodilatação induzida pela ACh, por meio do desacoplamento da eNOS e aparente envolvimento de estresse oxidativo, e pelo NPS, através de ação sobre a guanilato ciclase. Nossos estudos poderão contribuir para um melhor entendimento sobre o papel dos fatores liberados pelo tecido adiposo visceral sobre a função vascular e, consequentemente, sobre as alterações vasculares presentes na obesidade e patologias associadas.

Palavras-chave: Adipocina chemerin, reatividade vascular, tecido adiposo branco.

ABSTRACT

NEVES, KB. **Effects of the adipokine chemerin on the vascular reactivity: analysis in the rat aorta.** 2012. 98 p. Dissertation (master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Although hypertrophy and hyperplasia of adipocytes as well as increased synthesis and release of adipokines are commonly observed in obesity, a condition associated with insulin resistance and endothelial dysfunction, it is extremely important to understand the biological effects of adipokines, or more specifically of the adipokine chemerin, in non-pathological conditions. The mechanisms by which cytokines released by the adipose tissue may interfere with vascular function are not yet fully understood. Furthermore, the effects of the cytokine/adipokine chemerin on vascular function are not known. Considering that the chemerin receptor is expressed by vascular smooth muscle and endothelial cells, this study investigated the effects produced by this cytokine in vascular reactivity, as well as the mechanisms by which it modifies vascular function in non-obese animals. Our working hypothesis is that chemerin enhances vascular reactivity to constrictor stimuli, such as endothelin-1(ET-1) and phenylephrine (Phe), and decreases the vasodilation induced by acetylcholine (ACh) and sodium nitroprussiate (SNP). Our specific aims were to determine: 1) whether chemerin induces changes in vascular reactivity, 2) if the alterations of vascular reactivity induced by chemerin are mediated by changes in the function of endothelial cells or vascular smooth muscle cells, 3) which signaling pathways (focus on the MAPKs pathway) are being modified by chemerin and how they contribute to changes in vascular reactivity produced by this cytokine. Our study showed that the adipokine chemerin has biological and cellular activity in aortas from non-obese rats. Chemerin increased vascular responses to contractile stimuli (ET-1 and PhE), producing effects both in the endothelial and vascular smooth muscle cells. The increased contractile responses to ET-1 and PhE were mediated via activation of MEK-ERK1/2, COX-1 and COX-2 and increased expression of the ETA and ETB receptors. Furthermore, this adipokine reduced the vasodilation induced by ACh via eNOS uncoupling and oxidative stress, and by SNP, via effects in the enzyme guanylate cyclase. Our studies may contribute to a better understanding of the role of factors released by the visceral adipose tissue on vascular function and, consequently, on the vascular lesions in obesity and obesity-associated diseases.

Keywords: Adipokine chemerin, vascular reactivity, white adipose tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
Akt	proteína quinase B
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
BH₄	Tetrahidrobiopterina
cDNA	DNA complementar
CMKLR1	receptor semelhante ao de quimiocina 1
CMLV	células de músculo liso vascular
CO₂	monóxido de carbono
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
Ct	ciclo <i>threshold</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EC₅₀	concentração efetiva de um agonista que produz 50% do efeito máximo
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
EROS	espécies reativas de oxigênio
ETA	receptor de endotelina do subtipo A
ETB	receptor de endotelina do subtipo B
ET-1	endotelina-1
GCs	guanilato ciclase solúvel
GMPc	guanosina cíclica
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
KCl	cloreto de potássio
KH₂PO₄	fosfato de potássio monobásico
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MgSO₄	sulfato de magnésio

mN	miliNewton
NaCl	cloreto de sódio
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaHCO₃	bicarbonato de sódio
NFκB	fator de transcrição nuclear κB
NO	óxido nítrico
NOS	sintase de óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
O₂	oxigênio molecular
O₂⁻	ânion superóxido
•OH	radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
pD₂	logaritmo negativo da concentração de uma droga que induz 50% do efeito máximo
PCR	reação em cadeia da polimerase
PD 98059	inibidor ERK1/2
PBS	solução fosfato salina
PhE	Fenilefrina
pH	potencial hidrogeniônico
PI3K	fosfatidilinositol-3-fosfato quinase
RNA	ácido ribonucleico
SOD	superóxido-dismutase
TAB	tecido adiposo branco
Tiron	4,5-dihidroxi-ácido-1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Esquema 1. Principais sistemas-alvo da ação das adipocinas.....	21
Esquema 2. Esquema ilustrativo da hipótese do trabalho	29
Figura 1. Efeito da adipocina chemerin na contração induzida por PhE	42
Figura 2. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE	43
Figura 3. Efeito da adipocina chemerin na contração induzida por ET-1	44
Figura 4. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE e ET-1 na presença de inibidor de ERK 1/2	45
Figura 5. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da PhE na presença de um inibidor de ERK1/2.....	46
Figura 6. Imagens representativas do <i>western blot</i> para as proteínas MEK 1/2 e ERK 1/2....	47
Figura 7. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE na presença de antagonista de receptores ET _A (BQ-123)	49
Figura 8. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da PhE na presença de um antagonista de receptores ET _A (BQ-123).....	51
Figura 9. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE na presença de antagonista de receptores ET _B (BQ-788)	51
Figura 10. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE em vasos com endotélio na presença de antagonista de receptores ET _B (BQ-788).....	52
Figura 11. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE em vasos sem endotélio na presença de antagonista de receptores ET _B (BQ-788).....	53
Figura 12. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão de RNAm para pré-pró-ET-1, receptores ET _A , ET _B e CMKLR1	54
Figura 13. Imagens representativas do <i>western blot</i> para receptores ET _A e ET _B em aortas com endotélio submetidas à incubação com chemerin	55
Figura 14. Participação de metabólitos da COX na contração induzida por PhE	56
Figura 15. Participação dos metabólitos da COX na contração induzida por ET-1	59
Figura 16. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ET-1 na presença de um inibidor não-seletivo da COX.....	60
Figura 17. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da ET-1 na presença de um inibidor da COX-1 (SC-560).....	61

Figura 18. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da ET-1 na presença de um inibidor da COX-2 (SC-236).....	62
Figura 19. Participação de metabólitos da NOS na contração induzida por ET-1.....	63
Figura 20. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh	65
Figura 21. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ACh	66
Figura 22. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por NPS	66
Figura 23. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por BAY 41-2272...68	
Figura 24. Imagens representativas do <i>western blot</i> para a proteína eNOS nas formas total e fosforilada.....	69
Figura 25. Imagens representativas do <i>western blot</i> para a proteína GCα e GCβ.....	70
Figura 26. Imagens representativas do <i>western blot</i> para a proteína PDE5.....	71
Figura 27. Produção de GMPc avaliada na presença e ausência de chemerin (0,5 ng/mL) em aortas de rato	72
Figura 28. Imagens representativas do <i>western blot</i> para dímero e monômero da proteína eNOS.....	74
Figura 29. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh na presença de BH ₄	75
Figura 30. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da ACh na presença de BH ₄	75
Figura 31. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh na presença de Tiron	76
Figura 32. Efeito da adipocina chemerin sobre Emax da ACh na presença de Tiron	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de <i>pD2</i> da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin	43
Tabela 2. Valores de <i>pD2</i> da PhE em aortas de ratos com (E+) e sem endotélio (E-) incubadas com veículo e chemerin	44
Tabela 3. Valores de <i>pD2</i> da PhE e ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de um inibidor da ERK1/2.....	46
Tabela 4. Valores de <i>pD2</i> da PhE em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do antagonista de receptores ETA, BQ-123.....	50
Tabela 5. Valores de <i>pD2</i> da PhE em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do antagonista de receptores ETB, BQ-788.....	52
Tabela 6. Valores de <i>pD2</i> da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do inibidor não-seletivo da COX.....	56
Tabela 7. Valores de <i>pD2</i> da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do inibidor não-seletivo da COX.....	60
Tabela 8. Valores de <i>pD2</i> da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de inibidores seletivos da COX-1 e COX-2.....	61
Tabela 9. Valores de <i>pD2</i> da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de inibidor não-seletivo da NOS.....	63
Tabela 10. Valores de <i>pD2</i> do NPS em aortas de ratos sem endotélio incubadas com veículo e chemerin	67

Tabela 11. Valores de pD_2 do BAY 41-2272 em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo e chemerin68

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	20
2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. ANIMAIS	32
3.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR	32
3.2.1. Preparo dos Anéis de Aorta Torácica Isolada	32
3.2.1. Protocolos experimentais.....	33
3.2.1.1. Efeitos da adipocina chemerin sobre a contração induzida por ET-1 e PhE em aorta de rato	33
3.2.1.2. Efeitos da adipocina chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh, NPS e BAY 41-2272 em aorta de rato	33
3.2.1.3. Participação do endotélio na modulação dos efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aorta de rato	34
3.2.1.4. Participação de metabólitos da NOS na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato	34
3.2.1.5. Participação dos prostanóides na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato	34
3.2.1.6. Participação da ERK1/2 na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato	35
3.2.1.7. Participação dos receptores de ET-1, ET _A e ET _B , na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato	35
3.2.1.8. Participação do desacoplamento da eNOS sobre os efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato	35

3.2.1.9. Participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na vasodilatação induzida por ACh promovida pela adipocina chemerin em aorta de rato	35
3.3. QUANTIFICAÇÃO do RNAm E PROTÉICA.....	36
3.3.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)	36
3.3.1.1. Homogeneização do tecido.....	36
3.3.1.2. Extração do RNA.....	36
3.3.1.3. Precipitação do RNA	36
3.3.1.4. Quantificação do RNA	37
3.3.1.5. Reação de Transcriptase Reversa	37
3.3.1.5. PCR em tempo real.....	37
3.3.2. Western blotting	39
3.3.2.1. Extrato total	39
3.3.2.2. “Immunoblotting”.....	39
3.3.2.3. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da via ERK 1/2 em aorta de rato	40
3.3.2.4. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da eNOS em aorta de rato	40
3.3.2.5. Participação da adipocina chemerin no desacoplamento da eNOS em aorta de rato	40
3.3.2.6. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da guanilato ciclase (GC) em aorta de rato.....	41
3.3.2.7. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da fosfodiesterase 5 (PDE5) em aorta de rato.....	41
3.3.3. Determinação dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc).....	41
3.4. DROGAS E SAIS UTILIZADOS.....	41
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Efeito da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela PhE	43
4.2. Efeito da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela ET-1	45

4.3. Efeito da via ERK 1/2 sobre os efeitos vasculares da adipocina chemerin	46
4.4. Efeito da adipocina chemerin sobre a fosforilação de componentes da via de sinalização MEK-ERK1/2	48
4.5. Participação dos receptores ETA e ETB nos efeitos da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela PhE	50
4.6. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão do RNAm de pré-pró-ET-1, receptores ET _A e ET _B e receptor CMKLR-1	54
4.7. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica dos receptores ETA e ETB	55
4.8. Participação de metabólitos da COX e de suas isoformas nos efeitos da adipocina chemerin sobre a contração induzida por ET-1	57
4.9. Participação de metabólitos da NOS sobre os efeitos da adipocina chemerin na contração induzida por ET-1	62
4.10. Efeito da adipocina Chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh e NPS	65
4.11. Efeito da adipocina Chemerin sobre a vasodilatação induzida por BAY 41-2272	67
4.12. Efeito da adipocina chemerin sobre a fosforilação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS)	68
4.13. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão da guanilato ciclase (GC)	69
4.14. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão de fosfodiesterase-5 (PDE5)	70
4.15. Efeito da adipocina chemerin sobre a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)	71
4.16. Efeito da adipocina chemerin sobre o desacoplamento da eNOS	73
4.16. Efeito do BH ₄ sobre os efeitos da adipocina chemerin na vasodilatação induzida pela ACh	74
4.17. Participação do O ₂ ⁻ sobre os efeitos da adipocina Chemerin na vasodilatação induzida pela ACh	75
5- DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXO	98

1- INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é dividido em duas classes: 1) tecido adiposo marrom, composto por adipócitos multiloculares com abundante quantidade de mitocôndrias, que expressam elevados níveis de proteína desacopladora 1 (UCP-1), responsável pela atividade termogênica deste tecido (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2006; Dulloo, Jacquet *et al.*, 2010); e 2) tecido adiposo branco (TAB), responsável principalmente pelo armazenamento de gordura. O TAB é um tecido muito heterogêneo, constituído de diferentes tipos celulares, como fibroblastos, pré-adipócitos, adipócitos maduros, macrófagos, células do endotélio e do músculo liso vascular, nódulos linfáticos, células imunes e nervos (Ahima e Flier, 2000; Sanchez-Munoz, Garcia-Macedo *et al.*, 2005; Ahima, 2006). Sua distribuição é bastante abrangente e oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares por formar depósitos localizados em diversas regiões do organismo envolvendo diversos órgãos e estruturas internas. Por ser um excelente isolante térmico, também participa da manutenção da temperatura corporal. Outra função do TAB refere-se à sua capacidade de armazenar energia com necessidade de pouca água, o que faz deste tecido um importante sistema tamponante para o balanço energético (Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2006).

Os adipócitos são os principais componentes do tecido adiposo e armazenam lipídeos na forma de triacilgliceróis, resultantes da esterificação de glicerol-3-fosfato com ácidos graxos originados das lipoproteínas plasmáticas (quilomícrom e lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL) e da síntese intracelular a partir da acetilcoenzima A. Esse processo é denominado de lipogênese e para ocorrer depende da disponibilidade de substratos e cofatores e ativação de enzimas metabolicamente relacionadas (Hausman, Digirolamo *et al.*, 2001).

A mobilização de lipídeos dos adipócitos em períodos de escassez de energia é o processo denominado lipólise e consiste na hidrólise de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos livres (AGLs) e glicerol para o organismo. Os adipócitos possuem todas as enzimas necessárias para a lipogênese e a lipólise, sendo estes processos regulados pela disponibilidade de nutrientes, por hormônios, pelo sistema nervoso, por citocinas e outros fatores envolvidos no metabolismo energético (Ahima e Flier, 2000).

Além de ser considerado o maior reservatório energético do organismo, o TAB foi reconhecido nas últimas duas décadas como sendo uma importante fonte de citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas do sistema complemento.

Essa atividade secretora do TAB e sua interação com reguladores neuroendócrinos tornaram-no um importante órgão endócrino envolvido no controle de processos fisiológicos referentes ao metabolismo energético, à sensibilidade à insulina e à ingestão alimentar (Ahima e Flier, 2000; Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2006), podendo tornar-se alvo de avanços farmacológicos no tratamento da obesidade. Muitas destas moléculas secretadas pelo TAB podem também agir nas células endoteliais e interferir de modo direto no processo aterosclerótico (Hotamisligil, 2000).

A variedade de substâncias metabolicamente ativas secretadas pelo tecido adiposo foi chamada coletivamente de adipocitocinas ou adipocinas (Shuldiner, Yang *et al.*, 2001; Kougias, Chai *et al.*, 2005; Fonseca-Alaniz, Takada *et al.*, 2006; Yamawaki, 2011b). “Adipocinas” é um termo universal adotado em 2004 para descrever qualquer proteína secretada e sintetizada pelo tecido adiposo, seja ela uma citocina ou não (Yamawaki, 2011b). As adipocinas são conhecidas por afetar diferentes funções biológicas, incluindo a imunidade (fatores do complemento e haptoglobina), função endócrina (leptina, esteróides sexuais, e vários fatores de crescimento), função metabólica (ácidos graxos, adiponectina e resistina), e função cardiovascular (angiotensinogênio, inibidor do ativador do plasminogênio-1 [PAI-1], TNF- α [fator de necrose tumoral alfa], entre outras) (Kougias, Chai *et al.*, 2005). Em condições onde existe alteração na secreção de adipocinas pelo TAB, todas estas funções por elas moduladas podem ser prejudicadas.

Esquema 1. Principais sistemas-alvo da ação das adipocinas.

A obesidade, uma condição onde se observa um desequilíbrio na liberação e ação das adipocinas, de modo independente ou em associação com outras doenças, é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, hipertensão, doença coronariana, certos tipos de câncer, complicações respiratórias, dentre outras. O acúmulo de TAB, levando ao sobrepeso (índice de massa corporal 25-30 kg/m²) e à obesidade (índice de massa corporal ≥ 30 kg/m²), está relacionado com condições como dislipidemia, resistência à insulina e disfunção vascular, as quais contribuem para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Hubert, Feinleib *et al.*, 1983).

Quando se associa a obesidade como fator de risco para complicações vasculares, é importante considerar não apenas a magnitude da obesidade, mas também, e talvez este constitua o parâmetro mais relevante, a distribuição de gordura corporal. Há diferenças no risco atribuível à obesidade baseado na heterogeneidade de localização do tecido adiposo entre indivíduos obesos. Neste sentido, em adição à gordura corporal total, o acúmulo de gordura intra-abdominal ou visceral tem sido considerado como fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a adiposidade visceral, avaliada pela razão cintura-quadril (Larsson, Svardsudd *et al.*, 1984) ou por tomografia computadorizada (Nakamura, Yoshida *et al.*, 2000), está relacionada com doenças da artéria coronária, independentemente do índice de massa corporal.

Na obesidade há aumento dos depósitos de TAB, devido à hiperplasia e hipertrofia de seus adipócitos (Dulloo, Jacquet *et al.*, 2010). Esta disfunção do TAB, com aumento das adipocinas pró-inflamatórias e redução das adipocinas anti-inflamatórias, altera, dentre outras funções, a homeostase energética e a função vascular. O TNF- α , a leptina, a IL-6 [interleucina-6], a IL-1 β [interleucina-1 beta] e a adiponectina estão entre as citocinas mais bem caracterizadas e têm papel importante nas alterações associadas à obesidade, como a resistência à insulina e a disfunção vascular (Dulloo, Jacquet *et al.*, 2010).

Diversos mecanismos estão sendo sugeridos para explicar os efeitos das adipocinas sobre a reatividade vascular. Elas podem induzir a síntese de endotelina-1 (ET-1), levando a vasoconstrição; também podem induzir a expressão de várias enzimas que liberam mediadores de relaxamento [prostaciclina (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido nítrico (NO)] ou contração [prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TXA₂)]. As adipocinas podem também aumentar a produção de ânion superóxido (O₂⁻), que, por sua vez, reduz a biodisponibilidade de NO e, assim, o relaxamento dependente do endotélio. Há também a produção de peroxinitrito (ONOO⁻) devido ao aumento simultâneo de O₂⁻ e NO derivado da NO sintase induzível (iNOS), podendo diminuir a expressão e/ou atividade

da NO sintase endotelial (eNOS) em artérias de resistência (Peters, Unger *et al.*, 2003; Vila e Salaices, 2005).

Há um crescente número de evidências que sugerem uma ligação entre inflamação e risco de doença cardiovascular (Drexler e Hornig, 1999; Peters, Unger *et al.*, 2003; Viridis e Schiffrin, 2003). Isto porque a resposta inflamatória está associada à liberação de citocinas, as quais podem exercer um papel importante em lesões vasculares. Algumas citocinas são envolvidas na fase efetora da resposta inflamatória e incluem citocinas pró-inflamatórias, sendo as mais importantes o TNF- α , IL-1 β , e IL-6, bem como citocinas anti-inflamatórias, como TNF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (Kougias, Chai *et al.*, 2005; Vila e Salaices, 2005; Sprague e Khalil, 2009).

A resposta vascular parece estar relacionada com o equilíbrio entre todos os fatores vasoativos liberados sob a influência de citocinas/adipocinas e as diferenças na liberação e capacidade de resposta a esses fatores. Os efeitos das citocinas sobre a reatividade vascular parecem depender do leito vascular, além do tempo de exposição, que por sua vez, irá influenciar a liberação destes mediadores (Vila e Salaices, 2005).

Citocinas pró-inflamatórias podem induzir um aumento nas respostas vasoconstritoras induzidas por diferentes agonistas. Segmentos de artéria temporal humana incubados em cultura de órgão por 48 h com IL-1 β e TNF- α apresentaram maior resposta vasoconstritora mediada pela ativação de receptores ET_B (White, Juul *et al.*, 2000). Da mesma forma, o tratamento subcrônico por 3 dias com IL-1 β e IL-6 potencializou o efeito sobre a pressão de perfusão induzida pela ET-1 e norepinefrina (NE) em leito vascular mesentérico isolado de ratos (De Salvatore, De Salvia *et al.*, 2003).

Disfunção endotelial e elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias são observados em diversas doenças cardiovasculares, como insuficiência cardíaca congestiva, aterosclerose, choque séptico, diabetes e hipertensão (Drexler e Hornig, 1999; Matz, De Sotomayor *et al.*, 2000; Stewart, Zhang *et al.*, 2000; Cooper, Bonnet *et al.*, 2001; Peters, Unger *et al.*, 2003; Viridis e Schiffrin, 2003). Sob a influência de citocinas, como a leptina e IL-1 β , a dilatação dependente do endotélio pode ser prejudicada e o endotélio pode perder sua capacidade de responder aos hormônios circulantes ou autacóides. Este efeito pode favorecer uma predisposição ao espasmo do vaso, à trombose ou à aterogênese (Vila e Salaices, 2005).

Em resumo, as citocinas/adipocinas podem induzir vasoconstrição por aumentar as respostas induzidas por diferentes agonistas vasoconstritores. Além disso, a diminuição de respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio tem sido amplamente descritas em artérias de condutância e de resistência expostas a estas substâncias (Uracz, Uracz *et al.*, 2002). O fato

de que os níveis de citocinas estão elevados em diversas patologias cardiovasculares, onde a existência de disfunção endotelial também tem sido descrita, reforçam uma ligação entre a inflamação e as doenças cardiovasculares (Tedgui e Mallat, 2001).

A relação entre o acúmulo de tecido adiposo com a resistência à insulina e a disfunção endotelial também já foi comprovada por estudos demonstrando que, em indivíduos obesos, a perda de peso melhorou a sensibilidade à insulina e está associada com melhora na biodisponibilidade endotelial de NO, sugerindo que fatores liberados pelo tecido adiposo, como adipocinas, também influenciam parâmetros metabólicos e, consequentemente, a função vascular (Ziccardi, Nappo *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que, além da produção desregulada de citocinas/adipocinas, um importante determinante para as alterações vasculares observadas na obesidade é a localização do tecido adiposo. O acúmulo de gordura visceral na região do abdômen está associado com a disfunção microvascular e com a resistência à insulina na obesidade (Perticone, Ceravolo *et al.*, 2001). De fato, em leitos vasculares periféricos, demonstrou-se também que o acúmulo de gordura na região perivascular poderia contribuir para o aumento da resistência vascular periférica em modelo de hipertensão (Verlohren, Dubrovskaja *et al.*, 2004). No entanto, os mecanismos pelos quais esses fatores liberados pelo tecido adiposo promovem alterações vasculares na obesidade não são totalmente conhecidos.

Vale lembrar que as paredes dos vasos sanguíneos são compostas pelo endotélio, músculo liso e o tecido conjuntivo, incluindo elementos elásticos, dispostos em camadas concêntricas (ou túnicas), denominadas íntima, média e adventícia, que são nitidamente identificadas nos vasos mais calibrosos. Artérias e veias possuem estruturas diferentes. As paredes arteriais geralmente são mais espessas do que as venosas para suportar a maior pressão do sangue. À medida que os vasos ficam menores, ocorre uma diminuição gradativa da espessura da parede arterial, porém, a razão parede-luz aumenta (Shoen *et al.*, 1996).

As células musculares lisas vasculares (CMLVs) são o elemento celular predominante na camada média do vaso e são capazes de muitas funções, incluindo vasoconstrição e vasodilatação em resposta aos estímulos normais ou farmacológicos; síntese de vários tipos de colágeno, elastina e proteoglicanos; elaboração de fatores de crescimento e citocinas; migração e proliferação (Colaço, Tostes *et al.*, 2008). O endotélio vascular representa papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular. Além de proporcionar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, o endotélio regula ativamente o tônus vascular basal e a reatividade vascular em condições fisiológicas, respondendo a forças mecânicas e a mediadores neurohumorais, além de liberar uma variedade de fatores contráteis e relaxantes

(Furchgott e Vanhoutte, 1989). Frente a estímulos específicos, as células endoteliais podem liberar fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) (Moncada, Radomski *et al.*, 1988), como também fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) (Furchgott e Vanhoutte, 1989; Fruhbeck, 2004). Os EDRFs incluem o NO, a PGI₂ e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os EDCFs compreendem a angiotensina II (Ang II), a ET-1, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os prostanóides vasoconstritores (Feletou e Vanhoutte, 1999). Em condições fisiológicas, o tônus vascular é garantido pelo equilíbrio dos fatores contráteis e relaxantes. O desequilíbrio na produção e/ou liberação dos fatores envolvidos no relaxamento e na contração vasculares, com aumento de EDCFs e/ou diminuição dos EDRFs, caracteriza a disfunção endotelial (Mather, Mirzamohammadi *et al.*, 2002).

É válido ressaltar que as células vasculares também podem ativar mecanismos anti-inflamatórios, incluindo citocinas anti-inflamatórias, que mantém a integridade da parede vascular e homeostasia (Tedgui e Mallat, 2001). Embora recentes estudos indiquem claramente elevação dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias em várias patologias cardiovasculares (Drexler e Hornig, 1999; Matz, De Sotomayor *et al.*, 2000; Stewart, Zhang *et al.*, 2000; Cooper, Bonnet *et al.*, 2001; Peters, Unger *et al.*, 2003; Virdis e Schiffrin, 2003), uma terapia anticitocina ainda não foi comprovadamente eficaz. Uma compreensão aprofundada das vias anti-inflamatórias poderia identificar alvos promissores para novas possibilidades terapêuticas.

Além das adipocinas conhecidas e com funções já bem estabelecidas na literatura, outras tem sido descobertas recentemente, dentre elas a adipocina chemerin, foco deste estudo, identificada com 131-137 resíduos de aminoácidos (Bozaoglu, Bolton *et al.*, 2007; Roh, Song *et al.*, 2007). O aumento da expressão de chemerin nos adipócitos foi demonstrado em ratos alimentados com uma dieta com alto teor de gordura (Roh, Song *et al.*, 2007). Em humanos, a concentração de chemerin no sangue parece estar associada a vários componentes da síndrome metabólica, tais como elevado índice de massa corporal (IMC), aumento da concentração de triglicérides no sangue e pressão sanguínea elevada (Wittamer, Franssen *et al.*, 2003; Kutzleb, Busmann *et al.*, 2005; Bozaoglu, Bolton *et al.*, 2007; Goralski, McCarthy *et al.*, 2007; Sell e Eckel, 2009; Sell, Laurencikienė *et al.*, 2009). Foi demonstrado que as concentrações de chemerin no sangue estão aumentadas em pacientes severamente obesos (Sell, Divoux *et al.*, 2010).

A adipocina chemerin foi originalmente conhecida como um agente quimiotático para células do sistema imunológico, tais como macrófagos e células dendríticas (Wittamer, Franssen *et al.*, 2003). A pró-forma da proteína, pró-chemerin, é produzida principalmente

por adipócitos, fibroblastos, mastócitos e células endoteliais e circula no plasma como um precursor inativo. Uma vez secretado, o pró-chemerin pode ser ativado por serina proteases, como a triptase de mastócitos e elastase, produzidas por neutrófilos e mastócitos (Zabel, Allen *et al.*, 2005), através da clivagem de seis resíduos de aminoácidos na sua porção C terminal (Du e Leung, 2009; Luangsay, Wittamer *et al.*, 2009).

A adipocina chemerin ativa seletivamente um receptor da família das quimiocinas, o receptor para chemerin CMKLR1 (*chemokine-like receptor 1* ou ChemR23), que pertence à família de receptores acoplados a proteínas G_i (Wittamer, Gregoire *et al.*, 2004; Zabel, Silverio *et al.*, 2005; Bozaoglu, Bolton *et al.*, 2007; Roh, Song *et al.*, 2007; Takahashi, Takahashi *et al.*, 2008; Kaur, Adya *et al.*, 2010). O receptor para chemerin, CMKLR1 (ChemR23), é expresso por células endoteliais e CMLVs e sua expressão é regulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) (Kaur, Adya *et al.*, 2010). Assim, é provável que chemerin desempenhe um papel importante no estado inflamatório de células vasculares. Observou-se ainda que esta adipocina pode não ter efeitos sobre o estado inflamatório basal, mas pode induzir a produção de NO através da ativação da via PI3K [fosfatidilinositol-3-fosfato quinase]/Akt/eNOS, sugerindo que chemerin possa exercer efeitos anti-inflamatórios (Yamawaki, 2011a).

Apesar de ser uma nova adipocina e existirem diversas controvérsias sobre seu papel, sabe-se que chemerin influencia numerosos processos fisiológicos, como inflamação, metabolismo, proliferação e diferenciação celular (Roman, Parlee *et al.*, 2012). Estudos demonstram mecanismos de sinalização opostos ativados por esta adipocina. Em células humanas de músculo esquelético, chemerin inibiu a fosforilação da proteína quinase B [Akt] mediada pela insulina, assim como está relacionado à resistência à insulina através do impedimento da captação de glicose pela insulina (Sell, Laurencikiene *et al.*, 2009). Estudos com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), mostraram que esta adipocina ativa Akt/eNOS (Yamawaki, Kameshima *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que os efeitos da adipocina chemerin podem ser dependentes do tipo de célula ou tecido. Em ratos com deficiência (knockout) para o receptor semelhante ao de quimiocina-1 (CMKLR1) observou-se intolerância à glicose e captação de glicose reduzida no músculo esquelético e no tecido adiposo (Ernst, Haidl *et al.*, 2012).

A presença da adipocina chemerin em células endoteliais de tecidos inflamados e sua habilidade em recrutar macrófagos sugere o envolvimento desta citocina em processos inflamatórios (Wittamer, Franssen *et al.*, 2003; Zabel, Silverio *et al.*, 2005; Bozaoglu, Bolton *et al.*, 2007; Goralski, McCarthy *et al.*, 2007; Parolini, Santoro *et al.*, 2007). Neste sentido, foi

demonstrada recentemente uma correlação positiva entre expressão de chemerin no tecido adiposo aórtico e pericoronariano, bem como em células de músculo liso vascular da aorta, e processo arteriosclerótico (Spiroglou, Kostopoulos *et al.*, 2010). Além disso, os níveis circulantes de chemerin estão aumentados em uma série de doenças inflamatórias, tais como colite ulcerativa e doença de Crohn (Weigert, Obermeier *et al.*, 2010); doença hepática não-alcoólica (Kukla, Zwirska-Korczala, Hartleb *et al.*, 2010), hepatite C crônica (Kukla, Zwirska-Korczala, Gabriel *et al.*, 2010), doença desmielinizante autoimune (Graham, Zabel *et al.*, 2009), e lupus eritematoso (Gerl, Lischka *et al.*, 2010).

Além de os níveis séricos da adipocina chemerin estarem aumentados em pacientes obesos, como já comentado, um estudo recente de Ernst e colaboradores também mostrou que a expressão desta adipocina está aumentada em células do TAB frente à estimulação com IL-1 β *in vitro*. Assim, a adipocina chemerin pode ser a ligação funcional entre inflamação crônica, obesidade e distúrbios relacionados, tais como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (Ernst, Issa *et al.*, 2010; Ernst e Sinal, 2010).

A ligação de chemerin a ChemR23 leva ao aumento da fosforilação de p38, p44/42 (proteínas quinases ativadas por mitógenos - MAPKs) e Akt em células endoteliais, além do aumento da produção de gelatinases endoteliais ou metaloproteinases (MMP 2/9) (Kaur, Adya *et al.*, 2010). Com o bloqueio da MEK-1/2 (quinases ativadoras de quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2), a fosforilação de MAPKs p44/42 é impedida, mas não a de Akt. Portanto, acredita-se que eventos intracelulares estimulados por chemerin ocorrem através das vias da Akt e MEK/ERK1/2 (Kaur, Adya *et al.*, 2010). Demonstrou-se recentemente que chemerin também regula a produção de MMPs por condrócitos humanos *in vitro*. IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, bem como MMP-13 e outras MMPs foram significativamente aumentadas nos sobrenadantes de culturas de condrócitos estimulados com chemerin recombinante (Iannone e Lapadula, 2011).

Estudos *in vitro* também demonstraram que chemerin tem efeitos pró-angiogênicos, além de ativar as vias de sinalização PI3K/Akt e MAPKs em células endoteliais (Kaur, Adya *et al.*, 2010). Além disso, esta adipocina também induz a diferenciação de adipócitos e a adipogênese (Goralski, McCarthy *et al.*, 2007).

Em adipócitos, a adipocina chemerin ativa ERK1/2 (quinases reguladas por sinais extracelulares), p38MAPK, Akt ou PI3K e NF- κ B, levando à redução da resposta imune e aumento da adipogênese e da angiogênese (Yoshimura e Oppenheim, 2011). Entretanto, é importante mencionar que existem controvérsias a respeito destes efeitos, uma vez que ações anti-inflamatórias e de potenciação da captação de glicose estimulada pela insulina por

adipócitos também foram descritas para a adipocina chemerin (Cash, Hart *et al.*, 2008; Takahashi, Takahashi *et al.*, 2008).

Estudos indicam que os níveis séricos de chemerin estão significativamente elevados em pacientes com síndrome metabólica associada ou não a doença coronária, quando comparados a pacientes saudáveis. Além disso, estes níveis em indivíduos com síndrome metabólica foram positivamente correlacionados com IMC, pressão arterial sistólica (PAS), níveis de triglicérides e de proteína C reativa (PCR) aumentados. Os dados deste estudo fornecem evidências importantes para apoiar a correlação do chemerin aos fatores tradicionais na avaliação de risco cardiovascular e para o estabelecimento de estratégias de prevenção primária para doença coronária (Stejskal, Karpisek *et al.*, 2008; Dong, Ji *et al.*, 2011). Esses achados indicam então que a adipocina chemerin pode estar envolvida no desenvolvimento e na progressão da síndrome metabólica.

Embora alguns estudos tenham sido realizados no sentido de avaliar os efeitos de algumas citocinas/adipocinas pró-inflamatórias sobre a vasculatura, praticamente não se conhecem os efeitos da adipocina chemerin sobre a reatividade de aorta de ratos. Até o momento, não há na literatura nenhum estudo abordando os efeitos desta adipocina sobre a reatividade vascular à ET-1, fenilefrina (PhE, agonista alfa-1 adrenérgico), acetilcolina (ACh, vasodilatador dependente do endotélio) e nitroprussiato de sódio (NPS, vasodilatador independente do endotélio e/ou doador de NO). Portanto, considerando os indícios de que a adipocina chemerin está relacionada a diversos distúrbios que afetam a função vascular e que as adipocinas pró-inflamatórias podem exercer ações diretas sobre os vasos sanguíneos, além de ativar vias de sinalização e mediadores da contração e relaxamento, a hipótese do nosso trabalho é de que a adipocina chemerin aumenta a resposta vascular a estímulos contráteis e diminui a vasodilatação de aortas de ratos adultos não obesos.

Esquema 2. Esquema ilustrativo da hipótese do trabalho.

2- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A adipocina chemerin é constitutiva. É de suma importância o entendimento dos seus efeitos biológicos em condições não patológicas, embora seja na obesidade onde se observe hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e um aumento da síntese e liberação de adipocinas. O aumento da liberação de adipocinas pró-inflamatórias e a redução das anti-inflamatórias podem ter efeitos diretos sobre o sistema vascular. No entanto, os mecanismos pelos quais os fatores liberados pelo tecido adiposo podem interferir ou modular a função vascular não estão totalmente esclarecidos. Além disso, praticamente não se conhecem os efeitos da citocina/adipocina chemerin sobre a função vascular.

Levando-se em consideração que a adipocina chemerin é constitutiva e que seu receptor está presente no músculo liso vascular e no endotélio, o intuito deste trabalho foi avaliar se a adipocina chemerin possui atividade biológica e celular sobre a vasculatura em animais não obesos.

A investigação dos efeitos produzidos por esta citocina/adipocina na reatividade vascular e também a compreensão dos mecanismos pelos quais ela modifica a função vascular contribui para um melhor entendimento sobre o papel dos fatores liberados pelo tecido adiposo visceral sobre a função vascular e, conseqüentemente, sobre as alterações vasculares presentes na obesidade e patologias associadas à obesidade, tais como diabetes tipo 2, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares.

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos da adipocina chemerin na reatividade vascular e determinar os mecanismos (vias de sinalização, receptores) pelos quais ela modifica a função vascular de animais não obesos.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar se a adipocina chemerin promove alterações na reatividade vascular. Foram determinados os efeitos desta citocina sobre a reatividade vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores;
2. Determinar se as alterações de reatividade vascular promovidas pelo chemerin são mediadas por modificações da função das células endoteliais ou de células de músculo liso vascular;
3. Determinar quais vias de sinalização estão sendo modificadas pelo chemerin e como elas contribuem para as alterações de reatividade vascular produzidas por esta citocina. Investigamos detalhadamente uma via de sinalização ativada pela ET-1 (via das MAPKs).

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 adotado 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) (protocolo nº 10.1.1295.53.7).

Foram utilizados ratos *Wistar* (10-12 semanas), provenientes do biotério central do campus USP de Ribeirão Preto. Os ratos foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno, acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclos claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e alimento.

3.2. ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

3.2.1. *Preparo dos Anéis de Aorta Torácica Isolada*

Após anestesia com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.), as aortas torácicas foram removidas e colocadas em uma placa de petri contendo solução nutriente Krebs-Henseleit modificada a 4°C . A aorta foi dividida em anéis de 2-3mm de comprimento. Os anéis foram utilizados imediatamente para a realização de estudos funcionais na ausência ou presença de chemerin.

Os anéis foram montados em miógrafo (modelo 620M; Danish Myo Technology - DMT, Copenhagen, Denmark) para estudo da geração de força isométrica, conectado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália) acoplado a um computador. Os canais do miógrafo foram preenchidos com solução Krebs gaseificada com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2) e aquecidos à 37°C . As preparações permaneceram sob tensão basal de 30 mN por um período de 30 minutos para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 10 minutos. Todas as drogas foram diluídas em água. Em alguns anéis o endotélio foi mantido intacto e em outros removido mecanicamente.

Após o período de estabilização dos segmentos vasculares (30 minutos) em solução de Krebs-Henseleit, as artérias foram contraídas com a administração de cloreto de potássio (KCl, 120 mmol/L), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 30 minutos, a integridade do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à ACh (vasodilatador dependente de endotélio) em vasos pré-contraídos com PhE (1 μ mol/L). A ausência de relaxamento à ACh ou a presença de relaxamento de até 5% do valor da pré-contracção em anéis de aorta submetidos previamente à remoção mecânica do endotélio, foi dada como prova da retirada do endotélio. A resposta vasoconstritora induzida pela PhE ou ET-1 foi expressa como porcentagem em relação aos valores de contracção ao cloreto de potássio (KCl) e a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS) e BAY 41-2272 como porcentagem em relação à pré-contracção com PhE. Todas as incubações com a adipocina chemerin foram realizadas por um período de 1 hora.

3.2.1. Protocolos experimentais

3.2.1.1. Efeitos da adipocina chemerin sobre a contracção induzida por ET-1 e PhE em aorta de rato

Com o intuito de averiguar os efeitos do chemerin sobre a contracção induzida por ET-1 e PhE em aortas de ratos Wistar, curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1 (10^{-12} – 3×10^{-8} mol/L) e PhE (10^{-9} – 10^{-5} mol/L) foram obtidas em anéis com (E+) e sem (E-) endotélio submetidos à incubação com veículo (tampão fosfato salina [PBS] 0,1% albumina sérica bovina [BSA]) ou chemerin por 1 hora (0,5 ng/mL e 5 ng/mL).

3.2.1.2. Efeitos da adipocina chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh, NPS e BAY 41-2272 em aorta de rato

Para verificar os efeitos do chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh, NPS e BAY 41-2272 em aortas de ratos Wistar, curvas concentração-efeito cumulativas para ACh (10^{-9} – 3×10^{-5} mol/L), NPS (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) e BAY 41-2272 (10^{-10} – 3×10^{-5} mol/L) foram obtidas em anéis com, sem endotélio ou em ambos, respectivamente, submetidos à incubação com veículo ou chemerin por 1 hora (0,5 ng/mL e 5 ng/mL) e pré-contraídas com PhE (10^{-6} mol/L).

3.2.1.3. Participação do endotélio na modulação dos efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aorta de rato

A fim de examinar a participação do endotélio na modulação da resposta induzida pela adipocina chemerin em aorta de rato, curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1 ($10^{-12} - 3 \times 10^{-8}$ mol/L) e PhE ($10^{-9} - 10^{-5}$ mol/L) foram obtidas em anéis de aorta em ausência de endotélio.

3.2.1.4. Participação de metabólitos da NOS na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato

Com o objetivo de verificar a participação de metabólitos da NOS na modulação da resposta induzida por chemerin em aorta de rato, curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1 ($10^{-12} - 3 \times 10^{-8}$ mol/L) e PhE ($10^{-9} - 10^{-5}$ mol/L) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio intacto, em presença do inibidor não seletivo de NOS, N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 µmol/L), adicionado 30 minutos antes da incubação por 1 hora com chemerin.

3.2.1.5. Participação dos prostanóides na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato

Para investigar a participação dos prostanóides na modulação da resposta induzida por chemerin em aorta de rato, curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1 ($10^{-12} - 3 \times 10^{-8}$ mol/L) e PhE ($10^{-9} - 10^{-5}$ mol/L) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio intacto, em presença do inibidor não seletivo de COX, indometacina (10 µmol/L), adicionado 30 minutos antes da incubação por 1 hora com chemerin.

Além disso, para averiguar qual isoforma da COX está envolvida nos efeitos induzidos pela adipocina chemerin, curvas concentração-efeito cumulativas para ET-1 ($10^{-12} - 3 \times 10^{-8}$ mol/L) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio intacto, em presença de inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, SC-560 (10 µmol/L) e SC-236 (10 µmol/L), respectivamente, adicionado 30 minutos antes da incubação por 1 hora com chemerin.

3.2.1.6. Participação da ERK1/2 na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato

A fim de avaliar a influência da via ERK 1/2 sobre os efeitos da adipocina chemerin, alguns segmentos de aorta com e sem endotélio foram incubados por 30 minutos com PD98059 (1 $\mu\text{mol/L}$), um inibidor de ERK 1/2, antes da incubação por 1 hora com chemerin.

3.2.1.7. Participação dos receptores de ET-1, ET_A e ET_B, na modulação dos efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato

Para determinar a influência dos receptores de ET-1, ET_A e ET_B, sobre os efeitos do chemerin, alguns segmentos de aorta com e sem endotélio foram incubados por 30 minutos com antagonistas de receptores ET_A e ET_B (BQ 123 e BQ 788, respectivamente, 1 $\mu\text{mol/L}$) antes da incubação por 1 hora com chemerin.

3.2.1.8. Participação do desacoplamento da eNOS sobre os efeitos da adipocina chemerin em aorta de rato

Com o objetivo de determinar a participação do desacoplamento da eNOS na modulação da vasodilatação induzida pela ACh em aorta de rato, curvas concentração-efeito cumulativas para ACh (10^{-9} a 3×10^{-5} mol/L) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio intacto, em presença do cofator da eNOS, tetrahidrobiopterina (BH₄, 100 $\mu\text{mol/L}$) 30 minutos antes da incubação por 1 hora com veículo ou a adipocina chemerin.

3.2.1.9. Participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na modulação da vasodilatação induzida por ACh promovida pela adipocina chemerin em aorta de rato

Para verificar a participação de O₂⁻ na modulação da vasodilatação induzida pela ACh em aorta de rato, curvas concentração-efeito cumulativas para ACh (10^{-9} a 3×10^{-5} mol/L) foram obtidas em anéis de aorta com endotélio intacto, em presença do sequestrador seletivo de O₂⁻, 4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado (tiron, 100 $\mu\text{mol/L}$) (Pereira, Olivon *et al.*, 2010) 30 minutos antes da incubação por 1 hora com veículo ou a adipocina chemerin.

3.3. QUANTIFICAÇÃO GÊNICA E PROTÉICA

A expressão do RNAm e protéica da adipocina chemerin, receptores e componentes de vias de sinalização foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) e por *western blotting*, respectivamente, nos segmentos de aorta submetidos à incubação com chemerin ou veículo.

3.3.1. *Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real)*

Com o objetivo de avaliar o efeito da adipocina chemerin na expressão de RNAm para pré-pró-ET-1 e receptores ET_A e ET_B realizamos a técnica de PCR em tempo real em aortas de rato.

3.3.1.1. *Homogeneização do tecido*

As aortas de ratos incubadas por 1 hora com chemerin ou veículo foram rapidamente isoladas e congeladas 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).

3.3.1.2. *Extração do RNA*

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, 4°C) e a fase aquosa (superior) foi transferida para outro tubo.

3.3.1.3. *Precipitação do RNA*

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram acrescentados 500 µL de isopropanol. Os tubos foram misturados por inversão e incubados em -20°C por 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 15 minutos, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto ao *pellet*. As amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas a 12000 g, por 5 minutos a 4°C. Verteu-se o sobrenadante, incubou-se o pellet a temperatura ambiente por 5-10 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 10 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato).

3.3.1.4. Quantificação do RNA

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.

3.3.1.5. Reação de Transcriptase Reversa

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 primers randômicos (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, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até as reações de PCR em tempo real.

3.3.1.5. 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, em seguida a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 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 GENEBANK.

Foram analisados os seguintes genes (Life Technologies): pré-pró-ET-1 (Rn00561129_m1), receptor ET_A (Rn00561137_m1) e receptor ET_B (Rn00569139_m1). Como controle interno, utilizamos a β-actina (Rn00667869_m1).

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 $2^{\Delta\Delta Ct}$. Calculou-se a média de Ct e desvio padrão das triplicatas. Se o desvio padrão foi maior que 0,2 ciclos, o valor da triplicata mais discrepante foi excluído e recalculou-se a média. Os valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ de cada amostra foram normalizados (log10) e os grupos foram comparados por teste *t* Student.

3.3.2. Western blotting

3.3.2.1. Extrato total

Após 1 hora de incubação, segmentos da aorta foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e homogeneizados em tampão de lise gelado (Triton-X-100 1%, Tris 100mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF] 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml) com Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo protéico total foi quantificado, utilizando o método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1976) e as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditioneitol [DTT] 200 mM. Subsequentemente, 50 a 80 µg de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (dodecil sulfato de sódio electroforese em gel de poliacrilamida [SDS PAGE] 6 a 10%) em aparelho para mini gel (BioRad). Em cada gel havia um marcador com peso molecular com valores estabelecidos.

3.3.2.2. “Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, por meio de um aparelho também da BioRad por 2 horas a 120 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, cloreto de sódio [NaCl] 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C durante a noite para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas com anticorpos específicos para proteínas cujas vias de sinalização/receptores mostraram-se alterados pelo chemerin.

Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (0,3% de BSA) *overnight* na geladeira (4° C) e a concentração de cada anticorpo variou de 1:200 a 1:1000. Em seguida as membranas foram lavadas com a solução bloqueadora por 1 hora. Estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo, conjugado com peroxidase, por 1h em temperatura

ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ[®], NIH, USA).

3.3.2.3. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da via ERK 1/2 em aorta de rato

A participação da via ERK 1/2 sobre os efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aorta de rato com endotélio intacto foi determinada por *western blotting* após estímulos dos anéis arteriais com veículo (1 hora), chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora), ET-1 (100 nmol/L, 10 minutos) e ET-1 (100 nmol/L, 10 minutos) + chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora). Foram avaliadas as expressões protéicas de ERK 1/2 (anticorpo monoclonal de coelho contra p44/42 e phospho-p44/42; Cell Signaling 1:1000), MEK 1/2 (anticorpo monoclonal de coelho contra MEK1/2 e phospho-MEK1/2; Cell Signaling 1:1000), e MKP-1 (anticorpo policlonal de cabra contra DUSP1 e anticorpo monoclonal de coelho contra phospho-MKP1; Cell Signaling 1:1000).

3.3.2.4. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da eNOS em aorta de rato

A participação da eNOS sobre os efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aorta de rato foi determinada por *western blotting* após estímulos dos anéis arteriais na presença de endotélio com veículo (1 hora) e chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) (anti-eNOS e phospho-eNOS de coelho; Cell Signaling 1:1000).

3.3.2.5. Participação da adipocina chemerin no desacoplamento da eNOS em aorta de rato

A participação do desacoplamento da eNOS sobre os efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aorta de rato foi determinada por *western blotting* após estímulos dos anéis arteriais na presença de endotélio com veículo (1 hora) e chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora), seguindo protocolo anterior (Klatt, Schmidt *et al.*, 1995; Cai, Khoo, Mussa *et al.*, 2005).

A homogeneização dos anéis de aorta foi realizada em tampão de lise (Tris-HCl 50 mmol/L; Nonidet P-40 0,2%; NaCl 180 mmol/L; EDTA 0,5 mmol/L; PMSF 25 mmol/L; DTT

1 mmol/L; coquetel de inibidor de protease (Sigma P8849) 2uL para cada 1 mL de tampão e ortovanadato de sódio 0,01 mmol/L) por 2 horas. O sobrenadante, após centrifugação, foi mantido com tampão Laemmli 1:1 (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6.8; glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,01%; beta-mercaptoetanol 5%) no gelo até o momento da eletroforese. A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida 6,5% a 4°C. A transferência foi realizada para membranas de nitrocelulose também a 4°C. O bloqueio foi realizado por 2 horas em solução salina tamponada com Tris e Tween (TBS-T) 1% BSA e a incubação das membranas com anticorpo primário anti-eNOS (anti-eNOS de coelho; Cell Signaling 1:500) foi deixada durante a noite (*overnight*) a 4°C.

3.3.2.6. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da guanilato ciclase (GC) em aorta de rato

Os efeitos da adipocina chemerin sobre a fosforilação da GC em aortas de rato foram determinados por *western blotting* após estímulos dos anéis arteriais na presença de endotélio com veículo (1 hora) e chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) (anti-GC α de coelho – Abcam 1:2000; e anti GC β de coelho; Sigma 1:2000).

3.3.2.7. Participação da adipocina chemerin na fosforilação da fosfodiesterase 5 (PDE5) em aorta de rato

Os efeitos da adipocina chemerin sobre a fosforilação da PDE5 em aortas de rato foram determinados por *western blotting* após estímulos dos anéis arteriais na presença de endotélio com veículo (1 hora) e chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) (anti-PDE5 de cabra; Santa Cruz 1:1000).

3.3.3. Determinação dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

Para determinar os níveis de GMPc das artérias aortas de rato em condições experimentais, anéis com endotélio intacto foram incubados por 1 hora com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL) em solução de Krebs a 37° C em estufa de CO₂. Posteriormente, foram adicionados PhE (100 nmol/L) por 10 minutos, seguido por NPS (30 nmol/L) durante 10 minutos. Ao final destas incubações, foi adicionado Sildenafil (10 μ mol/L) por 5 minutos. Alguns tecidos foram congelados após a adição de sildenafil para obtenção de leituras da

linha de base. As artérias foram colhidas imediatamente e os segmentos foram congelados em nitrogênio líquido. Os anéis da artéria aorta congelados foram pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA 5%) e em seguida centrifugados a 1500 g durante 10 minutos a 4° C. O TCA foi extraído das amostras com três lavagens de éter saturado com água. Os pesos dos pellets secos foram utilizados para normalizar as diferentes amostras. A preparação do traçador, das amostras, padrões e incubação com o anticorpo foi realizada como recomendado pelo fabricante (Cayman Chemical GMP cíclica EIA Kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando diferentes diluições de amostras, como descrito anteriormente (Teixeira, Priviero *et al.*, 2007; Priviero, Jin *et al.*, 2010).

3.4. DROGAS E SAIS UTILIZADOS

Cloridrato de fenilefrina, PD98059, nitroprussiato de sódio, L-NAME, indometacina, BQ-123, BQ-788, SC-236 e SC-560, Tiron e cloreto de acetilcolina foram obtidos da Sigma Chemical CO (EUA); BAY 41-2272, endotelina-1 e tetrahidrobiopterina da Tocris Bioscience, Bristol (UK); tiopental sódico da Cristália; chemerin foi obtido da R&D Systems, Minneapolis (EUA). Todos os reagentes utilizados no PCR em tempo real foram obtidos da Invitrogen Life Technologies. Inibidor de protease, ortovanadato de sódio, Tween, BSA, Triton, EDTA e PMSF foram adquiridos da Sigma Chemical CO (EUA); DTT da Millipore; Tris, glicerol, mercaptoetanol e SDS foram obtidos da Synth[®]. Todos os outros sais utilizados foram obtidos da Merck[®].

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O teste “t” de Student ou a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer foram utilizados quando pertinente. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela PhE

A potência da PhE foi significativamente maior em vasos com endotélio incubados por 1 hora com chemerin quando comparados com vasos tratados com veículo (Figura 1A). Um papel modulatório negativo do endotélio sobre os efeitos induzidos por chemerin foi observado em vasos incubados com a adipocina. As incubações com chemerin aumentaram significativamente o Emax da PhE em aortas sem endotélio (Figura 1B). A Tabela 1 mostra os efeitos da adipocina chemerin sobre os valores de pD_2 da PhE em aortas de ratos com endotélio. A Figura 2 mostra os efeitos de chemerin sobre os valores de Emax da PhE em aortas de ratos sem endotélio.

Figura 1. Efeito da adipocina chemerin na contração induzida por PhE. As figuras mostram curvas concentração-efeito para PhE, em presença de duas concentrações de chemerin, em aortas de ratos Wistar com (A) e sem (B) endotélio. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=4-5 para cada grupo). (*) significativamente diferente (p < 0,05) em relação ao grupo veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 1 . Valores de pD_2 de PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin.

Grupos	pD_2
Veículo	$6,48 \pm 0,09$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$7,13 \pm 0,05$ (n=6)*
Chemerin 5 ng/mL	$7,24 \pm 0,08$ (n=6)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) vs. Veículo.

Figura 2. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos sem endotélio incubadas com veículo e chemerin. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração máxima. (n=5 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (*) vs. Veículo.

4.2. Efeito da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela ET-1

Chemerin aumentou a potência da ET-1 em aortas com endotélio incubadas por 1 hora com ambas as concentrações da adipocina (Figura 3A). Em vasos sem endotélio, ambas as concentrações de chemerin também aumentaram a potência da ET-1 (Figura 3B). Não foi observada alteração no E_{max} para ET-1, em artérias com ou sem endotélio, em ambos os grupos incubados com chemerin. A Tabela 2 mostra os efeitos da adipocina chemerin sobre os valores de pD_2 da ET-1 em aortas de ratos com e sem endotélio.

Figura 3. Efeito da adipocina chemerin na contração induzida por ET-1. As figuras mostram curvas concentração-efeito para ET-1, em presença de duas concentrações de chemerin, em aortas de ratos Wistar com (A) e sem (B) endotélio. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=4-5 para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 2. Valores de pD_2 de ET-1 em aortas de ratos com (E+) e sem endotélio (E-) incubadas com veículo ou chemerin.

Grupos	pD_2 (E+)	pD_2 (E-)
Veículo	$9,39 \pm 0,07$ (n=5)	$9,58 \pm 0,07$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$10,30 \pm 0,07$ (n=5)*	$11,61 \pm 0,04$ (n=4)*
Chemerin 5 ng/mL	$10,16 \pm 0,01$ (n=4)*	$11,48 \pm 0,06$ (n=4)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) vs. veículo.

4.3. Efeito da via ERK 1/2 sobre os efeitos vasculares da adipocina chemerin

A incubação dos anéis de aortas com o inibidor de ERK1/2 não promoveu alteração na curva concentração-efeito para PhE. A associação de chemerin e este inibidor deslocou a curva da PhE para a direita, mesmo em relação ao veículo. O inibidor reduziu a resposta máxima da PhE (Figura 4A).

O inibidor da ERK1/2 não promoveu alteração na curva concentração-efeito para ET-1. A associação de chemerin e PD 98059 deslocou a curva da ET-1 para a direita, sem alterar o Emax (Figuras 4B e 4C). A Tabela 3 mostra os efeitos do inibidor da ERK1/2 sobre os valores de pD_2 para PhE e ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin. A Figura 5 mostra os efeitos do inibidor de ERK1/2 sobre os valores de Emax para PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin.

Figura 4. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE e ET-1 na presença de inibidor de ERK 1/2. As figuras mostram curvas concentração-efeito para PhE em vasos incubados com chemerin 0,5 ng/mL (A); e ET-1 em vasos incubados com chemerin 0,5 ng/mL (B) e 5 ng/mL (C) na presença de PD 98059. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=5-6 para cada grupo). (*) e (#) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo ou chemerin, respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 3. Valores de pD_2 para PhE e ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença ou ausência de PD 98059.

Grupos	pD_2 PhE	pD_2 ET-1
Veículo	$6,87 \pm 0,06$ (n=4)	$9,31 \pm 0,05$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$8,02 \pm 0,09$ (n=4)*	$10,32 \pm 0,08$ (n=4)*
PD 98059	$7,08 \pm 0,06$ (n=4) #	$9,17 \pm 0,03$ (n=4) #
PD 98059 + Chem 0,5 ng/mL	$5,63 \pm 0,05$ (n=4) #	$8,92 \pm 0,07$ (n=4) #

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*), (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

Figura 5. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de PD 98059. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração máxima. (n=4 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey; (*) e (#) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) vs. veículo e chemerin respectivamente.

4.4. Efeito da adipocina chemerin sobre a fosforilação de componentes da via de sinalização MEK-ERK1/2

Chemerin (0,5 ng/mL por 1 hora) aumentou a expressão vascular das proteínas MEK1/2 (unidades arbitrárias [u.a.]: veículo= $0,79 \pm 0,09$; chemerin 0,5 ng/mL= $1,37 \pm 0,06$; ET-1= $1,37 \pm 0,05$; chemerin + ET-1= $2,12 \pm 0,12$; Figura 6A) e ERK1/2 (u.a.: veículo= $0,82 \pm 0,03$; chemerin 0,5 ng/mL= $1,20 \pm 0,02$; ET-1= $1,35 \pm 0,05$; chemerin+ET-1= $2,15 \pm 0,12$; Figura 6B) fosforiladas. ET-1 (10^{-7} mol/L) aumentou a expressão de MEK1/2 e ERK1/2, com valores similares àqueles observados em anéis de aorta incubados com chemerin. A fosforilação de MEK1/2 e ERK1/2 foi ainda mais elevada em vasos incubados com ET-1 e chemerin. Além disso, chemerin aumentou a expressão protéica da fosfatase de MAPK 1 (MKP1), uma enzima que inativa a via de sinalização das MAPKs (u.a.: veículo= $1,06 \pm 0,05$; chemerin 0,5 ng/mL= $1,90 \pm 0,13$; ET-1= $2,17 \pm 0,06$; chemerin+ET-1= $2,57 \pm 0,08$, Figure 6C).

Figura 6. Imagens representativas do *western blot* para as proteínas MEK 1/2 e ERK 1/2 nas formas total e fosforilada e MKP1 em aortas com endotélio submetidas ou não à incubação com chemerin. Nos gráficos a razão das formas total e fosforilada das proteínas MEK 1/2 (A) e ERK 1/2 (B) e MKP1 (C) normalizadas pela β -actina. Os dados representam média $\pm$ E.P.M. dos valores de expressão protéica. (n=5/grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey (*), (#) indica diferença significativa ($p < 0,05$) vs. Veículo e chemerin, respectivamente.

Conclusões Parciais

- *A adipocina chemerin promove aumento da resposta contrátil da PhE e ET-1 na presença e ausência de endotélio, sugerindo que este regula negativamente os efeitos desta adipocina.*
- *O aumento da resposta contrátil da PhE e ET-1 induzido pela adipocina chemerin é abolido na presença do inibidor de MEK1/2, sugerindo que a via MEK-ERK1/2 está mediando os efeitos desta adipocina.*
- *A incubação das aortas com chemerin promove aumento da expressão proteica de MEK1/2 e ERK1/2 fosforiladas, reforçando a ideia de que esta via esteja modulando os efeitos desta adipocina na vasculatura.*

4.5. Participação dos receptores ETA e ETB nos efeitos da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela PhE

Os efeitos da adipocina chemerin sobre a potência e Emax da vasoconstrição induzida pela PhE foram abolidos pelos antagonistas de receptores ETA, BQ-123, em aortas com endotélio (Figura 7A). Em aortas sem endotélio incubadas com chemerin na presença de BQ-123, observou-se efeito similar (Figura 7B). A Tabela 4 mostra os efeitos do antagonista de receptores ETA, BQ-123, sobre os valores de pD_2 para PhE em aortas de ratos com e sem endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin. As Figuras 8 e 9 mostram os efeitos do antagonista de receptores ETA, BQ-123, sobre os valores de Emax para PhE em aortas de ratos com e sem endotélio, respectivamente, incubadas com veículo e chemerin.

Figura 7. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE na presença de antagonista de receptores ETA (BQ-123). As figuras mostram curvas concentração-efeito para PhE em vasos com (A) e sem (B) endotélio incubados com chemerin 0,5 ng/mL na presença e ausência de BQ-123. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=4-6 para cada grupo). (*) e (#) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo e chemerin, respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 4. Valores de pD_2 da PhE em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do antagonista de receptores ETA, BQ-123.

Grupos	pD_2 E+	pD_2 E-
Veículo	6.87 ± 0.06 (n=4)	7.93 ± 0.06 (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	8.02 ± 0.09 (n=4)*	8.40 ± 0.06 (n=6)*
BQ-123	6.78 ± 0.05 (n=4) #	8.04 ± 0.08 (n=5) #
BQ-123 + Chem 0,5 ng/mL	6.88 ± 0.06 (n=4) #	7.88 ± 0.07 (n=5) #

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$) (*) (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

Figura 8. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de BQ-123. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração máxima. (n=4 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (#) vs. chemerin.

Figura 9. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos sem endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de BQ-123. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n=4 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (#) vs. chemerin.

Figura 10. Efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por PhE na presença de antagonista de receptores ETB (BQ-788). As figuras mostram curvas concentração-efeito para PhE em vasos incubados com BQ-788 e chemerin 0,5 ng/mL na presença (A) e ausência (B) de endotélio. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de contração ($n=5-6$ para cada grupo). (*) e (#) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo e chemerin, respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Em vasos com endotélio incubados com um antagonista de receptores ETB, BQ-788, observamos aumento da potência da PhE. Este efeito do BQ-788 não foi observado quando a incubação deste agonista foi associada à incubação com a adipocina chemerin. BQ-788 também reverteu o aumento de resposta contrátil a PhE induzida por chemerin (Figura 10A). Em vasos sem endotélio observou-se efeitos análogos (Figura 10B). A Tabela 5 mostra os efeitos do antagonista de receptores ETB, BQ-788, sobre os valores de pD_2 para PhE em aortas de ratos com e sem endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin. As Figuras 11 e 12 mostram os efeitos do antagonista de receptores ETB, BQ-788, sobre os valores de E_{max} para PhE em aortas de ratos com e sem endotélio, respectivamente, incubadas com veículo e chemerin.

Tabela 5. Valores de pD_2 da PhE em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência do antagonista de receptores ETB, BQ-788.

Grupos	pD_2 E+	pD_2 E-
Veículo	7.93 ± 0.06 ($n=4$)	6.48 ± 0.09 ($n=4$)
Chemerin 0,5 ng/mL	8.40 ± 0.06 ($n=6$)*	7.13 ± 0.05 ($n=6$)*
BQ-788	8.09 ± 0.05 ($n=5$)*	7.22 ± 0.11 ($n=6$) #
BQ-788 + Chem 0,5 ng/mL	7.93 ± 0.08 ($n=5$) #	6.31 ± 0.10 ($n=6$) #

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$) (*) (#) vs. veículo ou chemerin.

Figura 11. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de BQ-788. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração máxima. (n=4-6 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$) (*) (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

Figura 12. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da PhE. A figura mostra os valores de Emax da PhE em aortas de ratos sem endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de BQ-788. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração máxima. (n=4-6 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$) (*) (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

4.6. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão do RNAm de pré-pró-ET-1, receptores ETA e ETB e receptor CMKLR-1

A expressão do RNAm para pré-pró-ET-1 e para os receptores CMKRL1, ET_A e ET_B foi analisada pela técnica de PCR em tempo real. Observou-se que a adipocina chemerin aumentou significativamente a expressão de RNAm dos receptores ETA (veículo=0,91 ± 0,22; chemerin= 1,44 ± 0,20, Figura 13A), ETB (veículo= 0,85 ± 0,26; chemerin= 1,67 ± 0,33, Figura 13B) e CMKLR-1 (veículo= 0,68 ± 0,23; chemerin= 1,48 ± 0,29, Figura 13C), em relação ao grupo incubado com veículo. A expressão de RNAm de pré-pró-ET-1 não foi alterada (veículo= 1,13 ± 0,26; chemerin= 1,21 ± 0,34; Figura 13D).

Figura 13. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão de RNAm para pré-pró-ET-1, receptores ETA, ETB e CMKLR1. A figura mostra os valores de 2^{ΔΔCT} para pré-pró-ET-1, receptores ETA, ETB e CMKRL-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin 0,5 ng/mL. Os valores foram normalizados pelo produto correspondente da reação de PCR em tempo real para β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. (n=8-11 para cada grupo). Teste t (p < 0,05). (*) indica diferença significativa vs. veículo.

4.7. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica dos receptores ETA e ETB

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica dos receptores ETA e ETB, foram realizados ensaios de *western blotting* em aortas de ratos com endotélio incubadas por 1 hora com chemerin (0,5 ng/mL).

Observou-se que a adipocina chemerin produziu aumento da expressão dos dois subtipos de receptores, ETA e ETB, quando comparados aos vasos incubados com veículo (unidades arbitrárias: ETA - veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $1,14 \pm 0,01$; ETB - veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $1,18 \pm 0,04$; Figura 14).

Figura 14. Imagens representativas do western blot para receptores ETA e ETB em aortas com endotélio submetidas à incubação com chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) ou veículo. Os gráficos mostram a razão das proteínas dos receptores ETA e ETB pela β-actina. Os dados representam média ± E.P.M da expressão proteica dos receptores. (n=5 por grupo). (*) $p < 0,05$ indica diferença significativa vs. veículo. Teste t.

Conclusões Parciais

- *O aumento da resposta contrátil da PhE promovido pela adipocina chemerin é abolido pelos antagonistas de receptores ETA e ETB em vasos na presença e ausência de endotélio, sugerindo que estes dois subtipos de receptores da ET-1 estão mediando os efeitos desta adipocina.*
- *As incubações das aortas por 1 hora com chemerin promovem aumento da expressão proteica e de RNAm dos receptores ETA e ETB, reforçando os dados anteriores e sugerindo que o sistema ET-1 está envolvido nos efeitos desta adipocina em aortas de rato, efeito mediado por seus receptores.*
- *A adipocina chemerin não altera a expressão de RNAm de pré-pró-ET-1 após incubações de 1 hora, sugerindo que, neste período, esta adipocina não altera a síntese e/ou liberação de ET-1.*

4.8. Participação de metabólitos da COX e de suas isoformas nos efeitos da adipocina chemerin sobre a contração induzida por ET-1

A participação dos metabólitos da enzima COX no efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida por ET-1 e PhE foi avaliada através de curvas concentração-efeito para estes agonistas (10^{-12} a 3×10^{-8} e 10^{-9} a 3×10^{-5} mol/L, respectivamente), em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin 0,5 ng/mL e 5 ng/mL, pré-incubadas com indometacina, inibidor não-seletivo da COX (10^{-5} mol/L) ou veículo, por 30 minutos.

Artérias incubadas com o inibidor de COX apresentaram aumento da resposta contrátil a PhE em relação ao respectivo controle na ausência do inibidor. A associação chemerin e indometacina não promoveu alterações adicionais, não havendo alteração nos valores de pD_2 e E_{max} (Figuras 15A e 15B). A Tabela 6 mostra os efeitos do inibidor de COX, indometacina, sobre os valores de pD_2 para PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin.

Figura 15. Participação de metabólitos da COX na contração induzida por PhE. A figura mostra curvas concentração-efeito para PhE em aortas de ratos incubadas com chemerin 0,5 ng/mL (A) ou chemerin 5 ng/mL (B) em ausência ou presença de inibidor não-seletivo da COX. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n=4-6 para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 6. Valores de pD_2 da PhE em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de Indometacina.

Grupos	pD_2
Veículo	$6,48 \pm 0,09$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$7,13 \pm 0,05$ (n=6)*
Chemerin 5 ng/mL	$7,24 \pm 0,08$ (n=6)*
Indometacina	$7,12 \pm 0,11$ (n=4)*
Indometacina + Chem 0,5 ng/mL	$7,39 \pm 0,08$ (n=4)*
Indometacina + Chem 5 ng/mL	$6,87 \pm 0,08$ (n=4)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$) (*) vs. veículo.

Ao contrário do que ocorre com a PhE, o efeito da adipocina chemerin sobre a contração induzida pela ET-1 foi revertido após a adição de indometacina (Figuras 16A e 16B). A Tabela 7 mostra os efeitos do inibidor de COX, indometacina, sobre os valores de pD_2 para ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin. A Figura 17 mostra os efeitos do inibidor de COX, indometacina, sobre os valores de Emax para ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin.

Para determinar qual a isoforma da COX (COX-1 ou COX-2) está envolvida neste processo, foram realizadas curvas concentração-efeito para ET-1 em aortas incubadas com veículo ou chemerin 0,5 ng/mL, em presença de SC-560 (inibidor seletivo de COX-1, 10^{-5} mol/L, pré-incubado por 30 minutos) ou SC-236 (inibidor seletivo de COX-2, 10^{-5} mol/L, pré-incubado por 30 minutos). A adição de SC-560 e SC-236 em aortas de ratos reduziu significativamente o Emax da resposta contrátil da ET-1, abolindo os efeitos da adipocina chemerin sobre a vasoconstrição da ET-1 em relação ao respectivo grupo em ausência destes inibidores (Figuras 16C e 16D, respectivamente). A Tabela 8 mostra os efeitos dos inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, SC-560 e SC-236, respectivamente, sobre os valores de pD_2 para ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin. As Figuras 18 e 19 mostram os efeitos dos inibidores seletivos de COX-1 e COX-2,

SC-560 e SC-236, respectivamente, sobre os valores de Emax para ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin.

Figura 16. Participação de metabólitos da COX na contração induzida por ET-1. A figura mostra curvas concentração-efeito para ET-1 em aortas de ratos incubadas com chemerin 0,5 ng/mL (A) ou chemerin 5 ng/mL (B) em ausência ou presença de inibidor seletivo da COX-1 (C) e COX-2 (D). Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=4-5 para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao veículo. (#) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao chemerin 0,5 ng/mL ou chemerin 5 ng/mL. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 7. Valores de pD_2 da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de Indometacina.

Grupos	pD_2
Veículo	$8,60 \pm 0,04$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$9,59 \pm 0,15$ (n=6)*
Chemerin 5 ng/mL	$9,31 \pm 0,09$ (n=6)*
Indometacina	$8,34 \pm 0,09$ (n=4)
Indometacina + Chem 0,5 ng/mL	$8,55 \pm 0,02$ (n=4) #
Indometacina + Chem 5 ng/mL	$8,41 \pm 0,03$ (n=4) #

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) (#) vs. veículo ou chemerin.

Figura 17. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ET-1. A figura mostra os valores de Emax da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de Indometacina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de resposta máxima. (n=4-6 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (*), (#) vs. veículo e chemerin respectivamente.

Tabela 8. Valores de pD_2 da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de SC-236 e SC-560.

Grupos	pD_2
Veículo	$8,59 \pm 0,06$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$9,12 \pm 0,30$ (n=6)*
SC-560	$8,62 \pm 0,12$ (n=5) #
SC-236	$8,6 \pm 0,28$ (n=5)* #
SC-560 + Chem 0,5 ng/mL	$8,53 \pm 0,06$ (n=5) #
SC-236 + Chem 0,5 ng/mL	$8,68 \pm 0,10$ (n=5)* #

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) (#) vs. veículo ou chemerin.

Figura 18. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ET-1. A figura mostra os valores de Emax da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de SC-560. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. (n=4-6 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (*), (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

Figura 19. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ET-1. A figura mostra os valores de Emax da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin, na presença ou ausência de SC-236. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de resposta máxima. (n=4-5 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (*), (#) vs. veículo ou chemerin, respectivamente.

4.9. Participação de metabólitos da NOS sobre os efeitos da adipocina chemerin na contração induzida por ET-1

Para estudar a participação dos metabólitos da enzima NOS sobre os efeitos induzidos pela adipocina chemerin na contração induzida pela ET-1, foram realizadas curvas concentração-efeito para este agonista (10^{-12} a 3×10^{-7} mol/L) em aortas de rato com endotélio, pré-incubadas por 30 minutos com inibidor não seletivo da NOS, L-NAME (10^{-4} mol/L).

A adição de L-NAME aumentou os valores de pD_2 da ET-1 em aorta de ratos incubadas ou não com duas concentrações de chemerin (0,5 ng/mL ou 5 ng/mL) em relação ao grupo em ausência do inibidor, sem alterar os valores de E_{max} (Figuras 20A e 20B). A Tabela 9 mostra os efeitos do inibidor de NOS, L-NAME, sobre os valores de pD_2 para ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou com a adipocina chemerin.

Figura 20. Participação de metabólitos da NOS na contração induzida por ET-1. A figura mostra curvas concentração-efeito para ET-1 em aortas de ratos incubadas com chemerin 0,5 ng/mL (A) ou chemerin 5 ng/mL (B) em ausência ou presença de inibidor não-seletivo da NOS. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de contração. (n=4 para cada grupo). (*) significativamente diferente (p < 0,05) vs. veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 9. Valores de pD_2 da ET-1 em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin na presença e ausência de L-NAME.

Grupos	pD_2
Veículo	$8,60 \pm 0,04$ (n=4)
Chemerin 0,5 ng/mL	$9,68 \pm 0,17$ (n=4)*
Chemerin 5 ng/mL	$9,46 \pm 0,07$ (n=4)*
L-NAME	$10,31 \pm 0,07$ (n=4)*
L-NAME + Chem 0,5 ng/mL	$10,01 \pm 0,13$ (n=4)*
L-NAME + Chem 5 ng/mL	$9,94 \pm 0,06$ (n=4)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) vs. veículo.

Conclusões Parciais

- *O aumento da resposta contrátil da PhE promovido pela adipocina chemerin não é alterado pela adição de indometacina, sugerindo que os metabólitos da COX não interferem nos efeitos desta adipocina sobre a vasoconstrição induzida pela PhE.*
- *O aumento da resposta contrátil da ET-1 promovido pela adipocina chemerin é abolido pela adição de indometacina e inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, sugerindo que os metabólitos da COX-1 e 2 modulam os efeitos desta adipocina sobre a vasoconstrição induzida pela ET-1.*
- *O aumento da resposta contrátil da ET-1 promovido pela adipocina chemerin não é alterado pela adição de L-NAME, sugerindo que os metabólitos da NOS não interferem nos efeitos desta adipocina sobre a vasoconstrição induzida pela ET-1.*

4.10. Efeito da adipocina Chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh e NPS

O efeito da adipocina chemerin sobre a vasodilatação induzida por ACh e NPS, agonista de receptores muscarínicos e doador de óxido nítrico, respectivamente, foi avaliado pela realização de curvas concentração-efeito para estas drogas em aortas de ratos incubadas por 1 hora com chemerin em duas concentrações, 0,5 ng/mL e 5 ng/mL, pré-contraídas com PhE.

Chemerin produziu uma diminuição do relaxamento máximo da ACh, independentemente da sua concentração, sem alterar os valores de pD_2 (Figura 21). A Figura 22 mostra os valores de E_{max} para ACh em aortas de rato com endotélio incubadas com veículo ou chemerin.

A adipocina chemerin também promoveu uma redução do relaxamento induzido por NPS em relação ao grupo incubado com veículo, sem alterar os valores do E_{max} (Figura 23). A Tabela 10 mostra os efeitos da adipocina chemerin sobre os valores de pD_2 para NPS em aortas de ratos sem endotélio.

Figura 21. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh. A figura mostra curva concentração-efeito para ACh em aortas de ratos na presença e ausência de chemerin em duas concentrações. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento. (n=5 para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Figura 22. Efeito da adipocina chemerin sobre o Emax da ACh. A figura mostra os valores de Emax da ACh em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo e chemerin. Os dados representam a média ± E.P.M dos valores de resposta máxima. (n=5 para cada grupo). ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$); (*) vs. Veículo.

Figura 23. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por NPS. A figura mostra curvas concentração-efeito para NPS em aortas de ratos sem endotélio na presença e ausência de chemerin em duas concentrações. Os dados representam a média ± E.P.M dos valores de relaxamento. (n=4-5 para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 10. Valores de pD_2 do NPS em aortas de ratos sem endotélio incubadas com veículo ou chemerin.

Grupos	pD_2
Veículo	$8,57 \pm 0,05$ (n=5)
Chemerin 0,5 ng/mL	$7,39 \pm 0,10$ (n=4)*
Chemerin 5 ng/mL	$6,97 \pm 0,08$ (n=4)*

Os dados representam a média ± E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) vs. veículo.

4.11. Efeito da adipocina Chemerin sobre a vasodilatação induzida por BAY 41-2272

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre a vasodilatação induzida por BAY 41-2272, um ativador de guanilato ciclase independente de NO, foram realizadas curvas concentração-efeito para esta droga em aortas de ratos incubadas por 1 hora com chemerin em duas concentrações, 0,5 ng/mL e 5 ng/mL, pré-contraídas com PhE.

Chemerin, independentemente da sua concentração produziu diminuição do relaxamento induzido por BAY 41-2272, em vasos com endotélio e sem endotélio, sem alterar o Emax (Figuras 24A e 24B, respectivamente). A Tabela 11 mostra os efeitos da adipocina chemerin sobre os valores de pD_2 para BAY 41-2272 em aortas de ratos com e sem endotélio.

Figura 24. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por BAY 41-2272. A figura mostra curvas concentração-efeito para BAY 41-2272 em aortas de ratos com (A) e sem endotélio (B) na presença e ausência de chemerin em duas concentrações. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento ($n=4-6$ para cada grupo). (*) significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao grupo veículo. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Tabela 11. Valores de pD_2 do BAY 41-2272 em aortas de ratos com (E+) e sem (E-) endotélio incubadas com veículo ou chemerin.

Grupos	pD_2 (E+)	pD_2 (E-)
Veículo	8.47 ± 0.11 ($n=4$)	6.69 ± 0.06 ($n=5$)
Chemerin 0,5 ng/mL	7.76 ± 0.06 ($n=5$)*	6.13 ± 0.04 ($n=6$)*
Chemerin 5 ng/mL	7.82 ± 0.06 ($n=5$)*	6.07 ± 0.06 ($n=5$)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. ANOVA uma via com pós-teste Tukey ($p < 0,05$). (*) vs. veículo.

4.12. Efeito da adipocina chemerin sobre a fosforilação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS)

Para avaliar se a adipocina chemerin estaria modulando a ativação da enzima eNOS, investigamos a expressão desta enzima nas formas total e fosforilada. Observamos, por meio de experimentos de *western blotting*, que a adipocina chemerin produziu aumento da fosforilação de resíduo de serina (Ser¹¹⁷⁷) envolvido na ativação da eNOS (unidades arbitrárias: veículo= $0,99 \pm 0,04$; chemerin 0,5 ng/mL= $1,97 \pm 0,14$, Figura 25). Este dado mostra que não houve redução da expressão da eNOS. Pelo contrário, houve aumento de sua atividade.

Figura 25. Imagens representativas do *western blotting* para a proteína eNOS nas formas total e fosforilada em aortas com endotélio submetidas à incubação com chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) ou veículo. Os gráficos mostram a razão das formas total e fosforilada da proteína eNOS. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de expressão proteica. (n=6-8 por grupo). (*) $p < 0,05$ vs. veículo. Teste t.

4.13. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica da guanilato ciclase (GC)

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica da GC, realizamos ensaios de *western blotting* em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL, 1h).

Observamos que a adipocina chemerin promoveu diminuição da expressão das subunidades α (unidades arbitrárias: veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $0,61 \pm 0,11$, Figura 26) e β da GC (unidades arbitrárias: veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $0,71 \pm 0,07$, Figura 26).

Figura 26. Imagens representativas do *western blotting* para a proteína GCα (esquerda) e GCβ (direita) em aortas com endotélio submetidas à incubação com chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) ou veículo. Os gráficos mostram a razão da proteína GC pela β-actina. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de expressão proteica. (n=4-5 por grupo). (*) $p < 0,05$ vs. veículo. Teste t.

4.14. Efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica de fosfodiesterase-5 (PDE5)

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre a expressão proteica da PDE5, realizamos ensaios de *western blotting* em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL, 1h).

Observamos que a adipocina chemerin promoveu aumento da expressão da PDE5 (unidades arbitrárias: veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $1,78 \pm 0,42$, Figura 27).

Figura 27. Imagens representativas do *western blotting* para a proteína PDE5 em aortas com endotélio submetidas à incubação com chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) ou veículo. Os gráficos mostram a razão da proteína PDE5 pela β-actina. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de expressão proteica. (n=4-5 por grupo). (*) $p < 0,05$ vs. veículo. Teste t.

4.15. Efeito da adipocina chemerin sobre a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre a produção de GMPc, realizamos ensaios de Elisa em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL, 1h).

Observamos que a adipocina chemerin promoveu diminuição da produção de GMPc quando comparado ao veículo, ao controle positivo com NPS e ao grupo com níveis basais (pmol/mg de tecido seco: basal= 735.6 ± 72.09 ; NPS= 2832 ± 242.3 ; PhE= 432.9 ± 45.71 ; veículo= 584.9 ± 78.62 ; chemerin 0,5 ng/mL= 358.7 ± 84.93 , Figura 28).

Figura 28. Produção de GMPc avaliada na presença e ausência de chemerin (0,5 ng/mL) em aortas de rato. Os gráficos mostram a razão de GMPc pelo peso seco dos vasos. Os dados representam média $\pm$ E.P.M. (n=6 por grupo). (*); (π) $p < 0,05$ vs. basal e veículo, respectivamente. Anova de uma via com pós-teste Tukey.

Conclusões Parciais

- *A adipocina chemerin promove diminuição do relaxamento induzido pela ACh, sugerindo uma ação sobre a via NO-GMPc. No entanto, esta adipocina promove aumento da fosforilação de resíduo de serina envolvido na ativação da eNOS, evidenciando que o prejuízo da resposta da ACh observado na presença da adipocina chemerin não é proveniente da diminuição da expressão ou atividade desta enzima.*
- *A adipocina chemerin promove diminuição da resposta do NPS e BAY 41-2272, sugerindo que esta adipocina também esteja alterando a via NO-GMPc no MLV, com aparente prejuízo nos efeitos produzidos pela ativação da GCs.*
- *A adipocina chemerin promove diminuição da expressão proteica das subunidades α e β da GC, fato que justifica o deslocamento da curva do ativador de GC (BAY 41-2272), sugerindo que esta adipocina está alterando a função desta enzima.*
- *A adipocina chemerin promove aumento da expressão proteica da PDE5, enzima que hidrolisa o GMPc. Juntos, a diminuição da expressão proteica da GC e o aumento da expressão da PDE5, explicariam os níveis diminuídos de GMPc na presença desta adipocina.*

4.16. Efeito da adipocina chemerin sobre o desacoplamento da eNOS

Para avaliar o efeito da adipocina chemerin sobre o desacoplamento da eNOS, realizamos ensaios de *western blotting* avaliando a expressão proteica do dímero e monômero da eNOS em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL, 1h).

Observamos que a adipocina chemerin promoveu o desacoplamento da eNOS, já que a razão dímero-monômero mostrou-se diminuída em vasos incubados com esta adipocina (unidades arbitrárias: veículo= 1; chemerin 0,5 ng/mL= $0,59 \pm 0,07$, Figura 29).

Figura 29. Imagens representativas do *western blot* para dímero e monômero da proteína eNOS em aortas de rato com endotélio submetidas à incubação com chemerin (0,5 ng/mL, 1 hora) ou veículo. Os gráficos mostram a razão do dímero pelo monômero da proteína eNOS. Os dados representam média $\pm$ E.P.M dos valores de expressão proteica. (n=5 por grupo). (*) $p < 0,05$ vs. veículo. Teste t.

4.16. Efeito do BH_4 sobre os efeitos da adipocina chemerin na vasodilatação induzida pela ACh

Para confirmar se a adipocina chemerin estaria de fato levando a um desacoplamento da eNOS, avaliamos a ação do BH_4 (100 μ mol/L, 30 min) sobre os efeitos desta adipocina no relaxamento da ACh, uma vez que a diminuição deste cofator da eNOS é um dos principais fatores que favorece essa condição.

Nossos resultados mostraram que a adição de BH_4 foi capaz de reverter a diminuição da vasodilatação da ACh promovida pela adipocina chemerin (Figura 30). A Figura 31 mostra os valores de E_{max} da ACh em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin, em presença e ausência de BH_4 .

Figura 30. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh na presença de BH_4 . A figura mostra curvas concentração-efeito para ACh em aortas de ratos incubadas com chemerin (0,5 ng/mL, 1h), na presença e ausência de BH_4 . Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento. (n=5 para cada grupo). (*), (\$) $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e BH_4 + chemerin respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Figura 31. Efeito da adipocina chemerin sobre o E_{max} da ACh. A figura mostra os valores de E_{max} da ACh em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL), na presença ou ausência de BH_4 . Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento máximo (n=5-6 para cada grupo). (*), (\$) $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e BH_4 + chemerin respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

4.17. Participação do O_2^- sobre os efeitos da adipocina Chemerin na vasodilatação induzida pela ACh

Para verificar a participação do O_2^- nos efeitos promovidos pela adipocina chemerin sobre a vasodilatação induzida pela ACh, adicionamos um sequestrador de O_2^- , o Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min). Observamos que o Tiron reverteu a diminuição da vasodilatação da ACh promovido pela adipocina chemerin (Figura 32). A Figura 33 mostra os valores de E_{max} da ACh em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin, em presença e ausência de Tiron.

Figura 32. Efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento induzido por ACh na presença de Tiron. A figura mostra curvas concentração-efeito para ACh em aortas de ratos incubadas com chemerin(0,5 ng/mL, 1 hora), na presença e ausência de Tiron. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento ($n=5$ para cada grupo). (*), (&) $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e BH_4 + chemerin respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Figura 33. Efeito da adipocina chemerin sobre o E_{max} da ACh. A figura mostra os valores de E_{max} da ACh em aortas de ratos com endotélio incubadas com veículo ou chemerin (0,5 ng/mL), na presença ou ausência de Tiron. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M dos valores de relaxamento máximo. ($n=5-6$ para cada grupo). (*), (&) $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo e Tiron + chemerin respectivamente. ANOVA uma via com pós-teste Tukey.

Conclusões Parciais

- *A adipocina chemerin promove o desacoplamento da eNOS, uma vez que a relação dímero/monômero está diminuída, justificando a diminuição da resposta da ACh sem alteração da expressão da eNOS, já que o dímero é a forma ativa desta enzima.*
- *A diminuição da Emax da ACh promovida pela adipocina chemerin é revertida na presença de BH₄, um cofator da eNOS indispensável para a produção de NO. A diminuição dos níveis deste cofator é uma das principais causas do desacoplamento da eNOS. Portanto, este dado reforça o fato de que a adipocina chemerin está promovendo o desacoplamento da eNOs em aortas de rato.*
- *A diminuição da Emax da ACh promovida pela adipocina chemerin também é revertida na presença de Tiron, um sequestrador de anion superóxido, sugerindo que esta espécie está modulando os efeitos da adipocina chemerin em aortas de rato. Além disso, este dado abre perspectivas para um estudo mais aprofundado da participação das EROs e, conseqüentemente, do estresse oxidativo nas ações desta adipocina.*

5- DISCUSSÃO

O fato de que na obesidade, onde se observa hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, ocorre aumento da síntese e liberação de adipocinas, torna importante o entendimento dos seus efeitos biológicos em condições não patológicas.

A atuação da adipocina chemerin sobre o sistema imunológico parece bem caracterizada. Embora esta adipocina seja constitutiva e seu receptor esteja presente no músculo liso vascular e no endotélio, não há na literatura estudos que se refiram às suas ações sobre a vasculatura. Sabendo que citocinas/adipocinas modulam diversas vias de sinalização e mediadores dos processos de contração e relaxamento vascular, o intuito deste trabalho foi avaliar se a adipocina chemerin possui atividade biológica e celular sobre a vasculatura em animais não obesos e investigar os efeitos produzidos por esta adipocina na reatividade vascular e também compreender os mecanismos pelos quais ela modifica a função vascular.

O estudo de reatividade vascular (contração ou relaxamento) foi baseado em processos de interação droga-receptor por análise dos parâmetros farmacológicos de E_{max} e pD_2 , obtidos por regressão não-linear das curvas concentração-efeito. O efeito máximo que um agonista é capaz de produzir em um dado tecido sobre condições experimentais particulares é conhecido como E_{max} (Kenakin, 1997), um parâmetro farmacológico usado como ferramenta para a análise da eficácia dos agonistas. O valor de pD_2 é definido como $-\log EC_{50}$, sendo EC_{50} a concentração molar de um agonista que produz 50% de seu efeito máximo. É um parâmetro capaz de avaliar variações na potência dos agonistas (Kenakin, 1997).

Modificações de efeito máximo sugerem alterações na eficácia do agonista, incluindo: (1) fatores pré-interação que afetam a disponibilidade do agonista no compartimento do receptor; (2) fatores de interação que afetam a eficácia intrínseca do agonista; e (3) fatores pós-interação que afetam a eficiência da transdução do sinal deflagrado pela ativação do receptor (Kenakin, 2009). Já alterações de potência sugerem alterações de eficácia e/ou afinidade do agonista por seu receptor (Kenakin, 2009). Portanto, o efeito produzido por uma droga sobre um tecido depende da eficácia intrínseca do agonista, da sua afinidade pelos receptores e das características intrínsecas do tecido em estudo (Furchgott, 1967). Os efeitos desencadeados pelos agonistas farmacológicos podem ser influenciados por substâncias que estabelecem interações sinérgicas ou antagônicas com estes agonistas, podendo modificar o perfil de curvas concentração-efeito e, conseqüentemente os parâmetros farmacológicos obtidos (Kenakin, 1997).

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a adipocina chemerin, uma citocina constitutiva vascular, possui atividade biológica e celular mesmo em aortas de ratos não obesos. Observamos que esta adipocina promove disfunção vascular em aorta de ratos Wistar, caracterizada pelo aumento das respostas vasculares a estímulos contráteis à ET-1 e PhE, e pela diminuição de relaxamento à ACh e NPS, atuando tanto no endotélio quanto diretamente em células do músculo liso vascular. O aumento da resposta a estímulos contráteis parece estar relacionado à ativação de proteínas da família das MAPKs, em especial a ERK1/2, metabólitos da COX e participação dos dois subtipos de receptores de ET-1. A redução do relaxamento promovido por esta adipocina parece envolver o desacoplamento da eNOS com aparente participação de EROs, além de uma possível ação sobre a GC.

O importante papel da elevada adiposidade e da resistência à insulina como determinantes do desenvolvimento da disfunção vascular já foi demonstrado. De fato, a perda de peso é acompanhada por melhora da sensibilidade à insulina e também da biodisponibilidade endotelial de NO (Pierce, Beske *et al.*, 2008). Estes dados dão suporte à hipótese de que substâncias liberadas pelos adipócitos, tais como as adipocinas, realmente interferem na função vascular.

Em virtude dos fatores liberados pelo TAB exercerem seus efeitos no sistema vascular atuando não somente no endotélio (Uracz, Uracz *et al.*, 2002), mas também no músculo liso vascular (Soltis e Cassis, 1991), analisamos o efeito da incubação por uma hora com chemerin sobre a reatividade vascular em vasos com e sem endotélio. Nossos resultados indicaram que o efeito potencializador da adipocina chemerin sobre a contração induzida pela ET-1 e PhE em aorta de ratos independe de endotélio. No entanto, em vasos sem endotélio, os efeitos da adipocina chemerin mostraram-se ainda maiores. Isso sugere que o endotélio exerce um papel importante nesta resposta, modulando os efeitos promovidos pela adipocina chemerin sobre o músculo liso vascular.

Diversos estudos demonstraram que citocinas/adipocinas pró-inflamatórias podem induzir aumento das respostas vasoconstritoras induzidas por diferentes agonistas (White, Juul *et al.*, 2000; Uracz, Uracz *et al.*, 2002; De Salvatore, De Salvia *et al.*, 2003). Além disso, a atividade vasoconstritora da ET-1 está relacionada ao sobrepeso e à obesidade (Cardillo, Campia *et al.*, 2004; Tesauro e Cardillo, 2011), situações caracterizadas por aumento da carga oxidativa e inflamatória e elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Festa, D'agostino *et al.*, 2001; Keaney, Larson *et al.*, 2003), podendo associar-se à regulação da síntese e liberação de ET-1.

Na hiperinsulinemia, situação comum na obesidade, a atividade da ET-1 também está aumentada, e a insulina tem sido indicada como responsável pelo aumento da expressão de ET-1 em células endoteliais e do músculo liso vascular humano (Oliver, De La Rubia *et al.*, 1991; Anfossi, Cavalot *et al.*, 1993; Ferri, Pittoni *et al.*, 1995). Portanto, várias linhas de raciocínio sugerem um papel potencial da ET-1 na obesidade e fisiopatologias relacionadas (Weil, Westby *et al.*, 2011).

A contração promovida pela ET-1 é decorrente predominantemente da ativação de receptores ETA presentes no músculo lido vascular. O relaxamento induzido por este agonista é dado principalmente por ativação de receptores ET_B presentes no endotélio, entretanto, quando localizados no músculo liso vascular, estes promovem contração. A inativação dos receptores ET_B promove o comprometimento da liberação de fatores de relaxamento desencadeados pela ativação desses receptores, tais como, NO e PGI₂ (Noll, Wenzel *et al.*, 1996). Os resultados deste estudo mostraram que estes dois subtipos de receptores estão mediando os efeitos induzidos pela adipocina chemerin em aortas de ratos, uma vez que chemerin aumentou a expressão de RNAm e proteica de ambos os receptores e antagonistas dos receptores ETA e ET_B bloquearam os efeitos da chemerin sobre a contração induzida por PhE (como discutido a seguir).

Receptores ET_A ativados podem ligar-se a proteínas G monoméricas (Ras e Rho) e heterotriméricas de baixo peso molecular. Esta promiscuidade explicaria a estimulação de diferentes vias de transdução de sinal, incluindo o influxo de cálcio, ativação da fosfolipase C, da proteína quinase C (PKC), de MAPKs, quinases dependentes de Ca²⁺/calmodulina e, em maior nível de complexidade, a estimulação de vasoespasmo, estresse oxidativo, inflamação e proliferação celular (Ivey, Osman *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, ligantes de receptores agem no seu sítio ortostérico. No entanto, nos últimos anos, o conceito de modulação alostérica de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) representa uma abordagem cada vez mais viável para a descoberta de novas drogas (Raddatz, Schaffhauser *et al.*, 2007). Moduladores alostéricos são definidos como ligantes que atuam em um sítio do receptor que é topograficamente distinto do local de ligação ortostérico (Christopoulos, 2002), podendo alterar a afinidade ou eficácia dos ligantes, ou ainda de ambas as propriedades (Conigrave e Franks, 2003; Raddatz, Schaffhauser *et al.*, 2007). Estes ligantes podem modificar a conformação do receptor, promovendo uma mudança nas propriedades de ligação e/ou funcionais de ligantes ortostéricos ou, em alguns casos, podem alterar as propriedades funcionais do receptor na ausência de ligantes ortostéricos (May e Christopoulos, 2003).

Para esclarecer se os efeitos da adipocina chemerin sobre a contração vascular eram dependentes de componentes da via ET-1, as curvas de concentração-efeito para PhE foram realizadas na presença de antagonistas de receptores ETA, BQ-123, e ETB, BQ-788. A incubação com estes antagonistas aboliu o aumento da resposta vascular a PhE induzida pela adipocina chemerin. Estes resultados indicam que os dois subtipos de receptores para ET-1, ETA e ETB, estão mediando os efeitos desta adipocina e também adiciona uma informação importante sobre o papel da ET-1 sobre os efeitos das adipocinas na função vascular. Dados representando a expressão gênica e proteica de receptores ETA e ETB sugerem que, de fato, a adipocina chemerin altera o sistema ET-1, por meio do aumento da expressão de seus dois subtipos de receptores.

Adicionalmente, aumento na ativação de vias de sinalização envolvidas na vasoconstrição também poderia contribuir para os efeitos vasculares de citocinas/adipocinas (Yamawaki, 2011b). Uma das principais vias de sinalização recrutada pela ativação dos receptores para ET-1 é a das MAPKs (Bouallegue, Daou *et al.*, 2007). Vários relatos demonstraram que a ET-1 ativa MEK1/2, que por sua vez fosforila ERK1/2, promovendo contração das células musculares lisas vasculares (Zubkov, Rollins *et al.*, 2000; Ansari, Kazemipour *et al.*, 2004). Embora as vias de sinalização ativadas pela adipocina chemerin ainda não estejam bem estabelecidas, a ativação do receptor de chemerin (CMKLR1 ou ChemR23) é relatada como acionadora da fosforilação de ERK1/2 (Wittamer, Franssen *et al.*, 2003). A relevância deste efeito para as ações vasculares de chemerin ainda não foi descrita. Em nosso estudo a inibição da MEK1/2, com o composto PD98059, aboliu os efeitos de chemerin sobre a vasoconstrição induzida pela ET-1, tanto em vasos com quanto sem endotélio. De forma semelhante, os efeitos desta adipocina sobre a vasoconstrição induzida pela PhE também foram suprimidos pela inibição de MEK1/2. Este achado sugere fortemente que a ativação da via MEK-ERK1/2 contribui para efeitos da adipocina chemerin sobre a reatividade vascular.

Para confirmar se os efeitos observados sobre as respostas contráteis da ET-1 e PhE em vasos na presença de chemerin são mediados pela via MEK-ERK1/2, determinou-se a fosforilação destas proteínas. Os ensaios de western blotting mostraram que a adipocina chemerin aumenta a fosforilação de MEK1/2 e ERK1/2. Além disso, chemerin potencializa a fosforilação de MEK1/2 e ERK1/2 induzida pela ET-1. Estes dados confirmam nossos resultados anteriores, mostrando que esta adipocina aumenta a vasoconstrição induzida pela ET-1 e PhE por meio da ativação da via MEK-ERK1/2.

Ainda examinando os mecanismos que conduzem à ativação vascular de ERK1/2 por

chemerin e levando-se em consideração que a ativação de MAPKs pode ser modulada por vários passos, incluindo a dessensibilização de receptor, a dissociação de complexos de sinalização de receptores e desativação de mediadores da via (Liu, Shepherd *et al.*, 2007), partimos para outros membros desta via. Por conseguinte, as fosfatases são reguladores importantes das MAPKs. MKPs são fosfatases com dupla especificidade (DUSPs), que possuem a capacidade de desfosforilar resíduos de tirosina e treonina das MAPKs e, assim, inativá-las (Boutros, Chevet *et al.*, 2008). A fosfatase de MAPK 1 (MKP1) é conhecida para inativar ERK1/2 (Boutros, Nantel *et al.*, 2008), portanto, a adipocina chemerin poderia estar aumentando a ativação de ERK1/2 e da resposta vasoconstritora induzida pela ET-1 através da diminuição da atividade da MKP1. No entanto, observou-se que chemerin aumentou os níveis de MKP1, sugerindo que esta adipocina esteja regulando a expressão desta fosfatase como um feedback negativo para modular os seus efeitos sobre a ativação ERK1/2.

É importante considerar que, embora nossos resultados indiquem que chemerin e ET-1 agem através de uma via de transdução intracelular comum, esta adipocina parece ativar outros mecanismos adicionais para potencializar as respostas vasculares da ET-1 e PhE. Portanto, o aumento da atividade de outras quinases pode estar associado a estes efeitos. Assim, a potencialização da sinalização da ET-1 ou mesmo a transativação de vias acionadas tanto pela ET-1 quanto pela adipocina chemerin podem fornecer uma explicação para o aumento da fosforilação de MEK-ERK 1/2 pela ET-1 na presença também de chemerin.

Dentre outras quinases que tem sido relacionadas à resposta contrátil vascular, encontra-se uma pequena GTPase Rho e seu alvo Rho-quinase, que medeiam a sensibilização ao Ca^{2+} em células musculares lisas (Somlyo e Somlyo, 2000). A via de sinalização RhoA/Rho quinase pode ser ativada por muitos agonistas, incluindo a ET-1 (Scherer, Herzog *et al.*, 2002; Allahdadi, Walker *et al.*, 2007). Fortes evidências sugerem que o aumento da RhoA/Rho quinase contribui para a hipertensão e que sua inibição é capaz de reduzir a pressão sanguínea (Amano, Ito *et al.*, 1996; Uehata, Ishizaki *et al.*, 1997; Kawano, Yoshimura *et al.*, 2002; Seko, Ito *et al.*, 2003). Devido à contração aumentada para agonistas que ativam receptores acoplados à proteína G observada em aortas incubadas com chemerin, é possível que um dos mecanismos de geração dessas respostas poderia estar vinculado a uma regulação positiva desta via de sensibilização ao Ca^{2+} . No entanto, este aspecto merece maior aprofundamento e novos estudos.

A fim de verificar também a possível participação de metabólitos derivados da COX na contração induzida pela ET-1 em aortas de ratos na presença de chemerin, foram utilizados inibidores não específicos e específicos para COX. Os prostanoídeos (TXA_2 , PG e

prostaciclina) são derivados de eicosanoides por ação da enzima COX. A ativação da fosfolipase C (PLC), assim como da fosfolipase A₂ (PLA₂), é responsável pela liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana. A enzima COX catalisa a formação de PGH₂, subsequentemente convertida em TXA₂ pela TX sintase ou em PGI₂, PGE₂, PGD₂ ou PGF_{2α} pelas respectivas prostaglandinas sintases (Ubbink, Vermaak *et al.*, 1993).

Nossos resultados mostraram que o aumento da resposta da ET-1 observada em aortas de ratos com endotélio incubadas com chemerin, foi abolido na presença de indometacina, sugerindo a participação de metabólitos derivados de COX nos efeitos desta adipocina. Estes metabólicos parecem ser derivados tanto de COX-1 quanto COX-2, uma vez que inibidores específicos destas isoformas diminuíram a resposta da ET-1.

No presente estudo, o efeito da adipocina chemerin sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio também foi avaliado através da realização de curvas concentração-efeito cumulativas para NPS, um doador de NO, e ACh, um agonista muscarínico. Esta adipocina foi capaz de diminuir a vasodilatação induzida por estes fármacos em aortas de ratos. O NPS libera NO promovendo relaxamento via ativação da enzima guanilato ciclase (GC) e, conseqüentemente, formação de GMPc. Sendo assim, nossos resultados mostraram, através de curvas concentração-efeito cumulativas para um ativador de GC, o BAY 41-2272, que a adipocina chemerin pode exercer ações sobre esta enzima, uma vez que observamos um prejuízo na vasodilatação induzida por BAY 41-2272 na presença desta adipocina. Concluiu-se, portanto, que o sistema de transdução de sinal da GC no músculo liso vascular também parece ter sido afetado pela adipocina chemerin.

Como demonstrado em 1981 por Gerzer e colaboradores, a guanilato ciclase solúvel é um heterodímero que contém um grupamento heme como grupo prostético e a interação do NO a este grupamento foi proposto como o modelo de ativação desta enzima (Gerzer, Bohme *et al.*, 1981). Portanto, a GC é o alvo primário do NO e medeia a formação de GMPc, o mensageiro secundário da resposta vasodilatadora promovida pelo NO (Costell, Ancellin *et al.*, 2012). Confirmando a hipótese de que a adipocina chemerin estaria afetando a via NO-GMPc, nosso estudo mostrou que houve uma redução na expressão proteica das subunidades da GC e um aumento da expressão proteica da fosfodiesterase 5, enzima responsável pela degradação de GMPc. Finalmente, estes dois fatores juntos culminaram na redução da produção de GMPc como demonstrado neste estudo, justificando o prejuízo na vasodilatação observada em aortas incubadas com a adipocina chemerin.

A participação dos metabólitos da NOS na contração induzida pela ET-1 na presença de chemerin também foi avaliada. Observou-se que, em presença do inibidor inespecífico da

NOS, o L-NAME, não houve alteração nos parâmetros de E_{max} e pD_2 de vasos incubados com chemerin e contraídos com ET-1. Isto pode ser justificado por algumas possibilidades. A primeira seria que os metabólicos derivados da NOS, provavelmente NO, não estão modulando esta resposta. A transferência de elétrons durante a síntese de NO pela enzima NOS é um processo sensível à oxidação. Quando desestabilizada, ocorre a formação pela enzima de O_2^- em vez de NO, caracterizando o processo de desacoplamento (Forstermann e Munzel, 2006). O desacoplamento ocorre em condições de escassez do substrato L-arginina ou do cofator BH_4 , por ação de arginases e estresse oxidativo (Forstermann e Munzel, 2006). Este processo agrava o estresse oxidativo, sendo, portanto, causa e consequência deste processo. A outra possibilidade é que a redução da biodisponibilidade de NO por aumento de O_2^- culmine na perda da modulação negativa do NO sobre a resposta contrátil.

A ACh ativa a enzima eNOS e, conseqüentemente, aumenta a liberação de NO endotelial, promovendo, portanto, vasodilatação dependente de endotélio (Ungvari et al., 1999). A incubação com chemerin promoveu uma diminuição da resposta induzida pela ACh, indicando um prejuízo no mecanismo de relaxamento dependente do endotélio, ou seja, possivelmente houve alteração na síntese e/ou biodisponibilidade de NO endotelial. No entanto, ao contrário do esperado, a fosforilação da eNOS (Ser¹¹⁷⁷) foi aumentada pela incubação com chemerin. Isto levanta a hipótese de um possível desacoplamento da eNOS, conforme descrito por Topal et al (2004), em decorrência da redução intracelular de BH_4 (Topal, Brunet *et al.*, 2004). Outra possibilidade é de que a biodisponibilidade de NO esteja comprometida em decorrência do estresse oxidativo induzido por citocinas pró-inflamatórias.

O óxido nítrico é uma molécula de sinalização endógena sintetizada por uma família de NO sintases (NOS) que inclui a NOS induzível, neuronal, e endotelial (nNOS, iNOS, e eNOS, respectivamente). A NOS mantém dois domínios catalíticos que consistem de um domínio redutase C-terminal e outro oxigenase N-terminal (Marletta, 1993; Hemmens, Goessler *et al.*, 2000). As três isoformas da NOS são enzimas diméricas compostas de duas subunidades idênticas (Miller, Martasek *et al.*, 1997; Raman, Li *et al.*, 1998). Dimerização é uma exigência absoluta para toda a atividade catalítica da NOS (Ghosh, Abu-Soud *et al.*, 1996; Venema, Ju *et al.*, 1997). O BH_4 , um cofator essencial para a atividade de todas as enzimas NOS (Stuehr e Griffith, 1992; Cosentino e Luscher, 1999), é necessário para promover e possivelmente estabilizar a proteína eNOS na forma homo-dímero ativo (Tzeng, Billiar *et al.*, 1995; Cai, Alp *et al.*, 2002). A descoberta paradoxal de um aumento concomitante na expressão de eNOS e uma reduzida vasodilatação dependente do endotélio (Bouloumie, Bauersachs *et al.*, 1997; Cosentino, Hishikawa *et al.*, 1997) tem chamado a

atenção para o fato de eNOS por si só, em estados patológicos, tornar-se uma fonte de O_2^- , processo assim chamado de desacoplamento da eNOS (Stuehr, Pou *et al.*, 2001)

A eNOS converte o aminoácido L-arginina e O_2 a quantidades equimolares de NO e L-citrulina no endotélio. Este processo enzimático consome NADPH e requer Ca^{2+} /calmodulina, flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleótido e tetrahydrobiopterina (BH_4) como cofatores da NOS (Ignarro e Cech, 1976; Palmer, Ferrige *et al.*, 1987; Moncada e Higgs, 2006). Tem sido sugerido que a disponibilidade limitada de BH_4 é uma dos principais fatores que contribui para a disfunção da eNOS na hipercolesterolemia, diabetes, aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca (Scott-Burden, 1995; Stroes, Kastelein *et al.*, 1997; Cosentino e Luscher, 1998; Cai e Harrison, 2000; Landmesser, Dikalov *et al.*, 2003). Na hiperglicemia diabética, por exemplo, observa-se um prejuízo na expressão e na atividade da enzima GTP ciclodrolase I (GTPCH-I), responsável pela síntese do co-fator tetrahydrobiopterina (BH_4), por mecanismos independentes de O_2^- , processo que resulta em desacoplamento de eNOS e comprometimento na produção de NO endotelial (Ding, Hayashi *et al.*, 2004; Wenzel, Daiber *et al.*, 2008).

O desacoplamento da eNOS tem sido associado tem sido associado à sua monomerização (Zou, Shi *et al.*, 2002) e a uma redução na disponibilidade de BH_4 e diversos estudos mostraram que, em condições de hipercolesterolemia, hipertensão e diabetes, a suplementação deste cofator é geralmente capaz de restaurar a função da eNOS e consequentemente a formação de NO (Cosentino e Luscher, 1999; Vasquez-Vivar, Martasek *et al.*, 2002; Alp e Channon, 2004). Nossos resultados mostraram que a adição de BH_4 foi capaz de reverter o prejuízo da vasodilatação da ACh promovido pela adipocina chemerin, nos permitindo sugerir que a disfunção observada nas respostas da ACh são derivadas do desacoplamento da eNOS, processo que foi confirmado neste estudo pela diminuída relação dímero/monômero da eNOS.

No estudo de Cai e colaboradores (Cai, Khoo e Channon, 2005) demonstrou-se uma redução importante da relação dímero/monômero da eNOS em combinação com o aumento do estresse oxidativo. Em doenças vasculares, tais como diabetes e disfunção endotelial, ocorre diminuição na biodisponibilidade de NO e um aumento concomitante da formação de O_2^- (Creager, Luscher *et al.*, 2003), apesar dos níveis proteicos e de RNAm da eNOS serem mantidos ou mesmo aumentados (Cosentino, Hishikawa *et al.*, 1997; Zou, Shi *et al.*, 2002). Estudos anteriores sugerem que desacoplamento da eNOS pode, parcialmente, ser responsável pela redução da produção de NO e aumento de O_2^- (Stuehr e Griffith, 1992). Portanto, investigamos a participação de EROs sobre os efeitos da adipocina chemerin. Observamos

que a remoção do O_2^- , por meio da adição de um sequestrador de O_2^- (Tiron) foi capaz de reverter o prejuízo na vasodilatação da ACh encontrado em vasos incubados com a adipocina chemerin, sugerindo que o estresse oxidativo está de fato envolvido na ações promovidas por esta adipocina em aorta de rato.

Nossos resultados mostraram que, em aortas de ratos, a adipocina chemerin induz à produção de O_2^- , provavelmente derivado da eNOS desacoplada, fato que não descarta a possibilidade de participação de outras vias formadoras de EROs. No entanto, estudos posteriores devem ser realizados para confirmar tal sugestão. Por outro lado, a produção de O_2^- poderia também contribuir com a hiperreatividade contrátil à ET-1 e PhE promovida por esta adipocina, uma vez que o O_2^- induz a um tônus contrátil pelo fechamento direto de canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Liu e Gutterman, 2002), pelo fechamento indireto dos canais para K^+ ativados por Ca^{++} (BK_{Ca}) (Liu e Gutterman, 2002), pela ativação de ERK1/2 (Ding, Chapman *et al.*, 2007) ou pela ativação de receptores para rianodina (Du, Frazier *et al.*, 2005).

Em síntese, nosso estudo mostrou que a adipocina chemerin causa alterações na reatividade vascular a PhE e ET-1, mediadas por receptores ETA e ETB, decorrentes também da ativação de MAPKs, especialmente MEK-ERK1/2, com interferência na produção e/ou liberação de metabólitos derivados da COX e sem ação aparente dos metabólitos da NOS. Além disso, esta adipocina diminuiu os relaxamentos promovidos pela ACh, possivelmente como consequência do desacoplamento da eNOS, uma importante condição geradora de EROs. Os efeitos de chemerin sobre a vasodilatação induzida pela ACh são revertidos na presença de um sequestrador de O_2^- , fato que reforça ainda mais a possibilidade do envolvimento do estresse oxidativo nas ações da adipocina chemerin em aortas de ratos. Observamos também uma diminuição do relaxamento induzido pelo NPS e BAY 41-2272, provavelmente devido à diminuição da expressão proteica da GC e aumento da PDE5, fatores que juntos culminaram na redução da produção de GMPc.

Nossos resultados indicam um papel funcional importante do tecido adiposo sobre a reatividade vascular. Sugerem ainda que o desequilíbrio entre as adipocinas pró e anti-inflamatórias, especificamente com aumento das primeiras e diminuição das últimas, como acontece na obesidade e diversas outras doenças metabólicas e cardiovasculares, pode estar modulando a resposta vascular, principalmente nestas condições.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou, experimentalmente *in vitro*, os efeitos da adipocina chemerin em aortas de ratos. Esta adipocina pró-inflamatória potencializa a resposta contrátil da PhE e ET-1 atuando tanto no endotélio quanto no músculo liso vascular, ativando as vias MEK-ERK1/2. Além disso, nossos dados demonstram que os metabólitos da COX e o sistema ET-1, por meio do aumento da expressão de seus dois subtipos de receptores, medeiam os efeitos desta adipocina. Por fim, observamos que chemerin também prejudica a vasodilatação induzida pela ACh, efeito justificado pelo desacoplamento da eNOS e estresse oxidativo promovido por esta adipocina, e NPS e BAY 41-2272, através da diminuição da expressão proteica da guanilato ciclase e aumento da expressão de PDE5, finalmente culminando na redução da produção de GMPc. Enfim, a adipocina chemerin acarreta uma exacerbação de respostas contráteis e prejuízo na capacidade de vasodilatação de aortas de ratos, fato que poderia ser responsável pelo processo de disfunção vascular observado na obesidade e doenças relacionadas. Estes resultados podem contribuir para um melhor entendimento do papel das adipocinas na reatividade vascular em condições fisiológicas e fisiopatológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14 Suppl 5, p. 242S-249S, Aug 2006.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 11, n. 8, p. 327-32, Oct 2000.
- ALLAHDADI, K. J.; WALKER, B. R.; KANAGY, N. L. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 5, p. H2911-8, Nov 2007.
- ALP, N. J.; CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 3, p. 413-20, Mar 2004.
- AMANO, M. et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20246-9, Aug 23 1996.
- ANFOSSI, G. et al. Insulin influences immunoreactive endothelin release by human vascular smooth muscle cells. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 42, n. 9, p. 1081-3, Sep 1993.
- ANSARI, M. et al. A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 10, p. 1166-70, Oct 2004.
- BOUALLEGUE, A.; DAOU, G. B.; SRIVASTAVA, A. K. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. **Current vascular pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 45-52, Jan 2007.
- BOULOUMIE, A. et al. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 934-41, Oct 1997.
- BOUTROS, T.; CHEVET, E.; METRAKOS, P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 3, p. 261-310, Sep 2008.
- BOUTROS, T. et al. The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 8, n. 12, p. 2558-68, Dec 2008.
- BOZAOGLU, K. et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4687-94, Oct 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840-4, Nov 10 2000.

CAI, S. et al. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation. **Cardiovascular research**, v. 55, n. 4, p. 838-49, Sep 2002.

CAI, S.; KHOO, J.; CHANNON, K. M. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. **Cardiovascular research**, v. 65, n. 4, p. 823-31, Mar 1 2005.

CAI, S. et al. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. **Diabetologia**, v. 48, n. 9, p. 1933-40, Sep 2005.

CARDILLO, C. et al. Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. **Hypertension**, v. 43, n. 1, p. 36-40, Jan 2004.

CASH, J. L. et al. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 4, p. 767-75, Apr 14 2008.

CHRISTOPOULOS, A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 3, p. 198-210, Mar 2002.

CONIGRAVE, A. D.; FRANKS, A. H. Allosteric activation of plasma membrane receptors--physiological implications and structural origins. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 81, n. 3, p. 219-40, Apr 2003.

COOPER, M. E. et al. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. **American journal of hypertension**, v. 14, n. 5 Pt 1, p. 475-86, May 2001.

COSENTINO, F. et al. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 25-8, Jul 1 1997.

COSENTINO, F.; LUSCHER, T. F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 32 Suppl 3, p. S54-61, 1998.

COSENTINO, F. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. **Cardiovascular research**, v. 43, n. 2, p. 274-8, Aug 1 1999.

CREAGER, M. A. et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. 1527-32, Sep 23 2003.

DE SALVATORE, G. et al. Effects of in vivo treatment with interleukins 1beta and 6 on rat mesenteric vascular bed reactivity. **Autonomic & autacoid pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 125-31, Apr 2003.

DING, L. et al. ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 292, n. 6, p. H2997-3005, Jun 2007.

DING, Q. F. et al. The effect of high glucose on NO and O₂- through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase. **Life sciences**, v. 75, n. 26, p. 3185-94, Nov 12 2004.

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**, v. 50, n. 10, p. 1093-7, 2011.

DREXLER, H.; HORNIG, B. Endothelial dysfunction in human disease. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 31, n. 1, p. 51-60, Jan 1999.

DU, W. et al. Redox activation of intracellular calcium release channels (ryanodine receptors) in the sustained phase of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. **Chest**, v. 128, n. 6 Suppl, p. 556S-558S, Dec 2005.

DU, X. Y.; LEUNG, L. L. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 41, n. 12, p. 973-9, Dec 2009.

DULLOO, A. G. et al. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. **International journal of obesity**, v. 34 Suppl 2, p. S4-17, Dec 2010.

ERNST, M. C. et al. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance. **Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 672-82, Feb 2012.

ERNST, M. C. et al. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 1998-2007, May 2010.

ERNST, M. C.; SINAL, C. J. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 21, n. 11, p. 660-7, Nov 2010.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 50, n. 4, p. 525-34, Dec 1999.

FERRI, C. et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels in vivo. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 80, n. 3, p. 829-35, Mar 1995.

FESTA, A. et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal**

of the **International Association for the Study of Obesity**, v. 25, n. 10, p. 1407-15, Oct 2001.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-29, Apr 2006.

FORSTERMANN, U.; MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-14, Apr 4 2006.

FRUHBECK, G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. **Current medicinal chemistry. Cardiovascular and hematological agents**, v. 2, n. 3, p. 197-208, Jul 2004.

FURCHGOTT, R. F. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 139, n. 3, p. 553-70, Feb 10 1967.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 9, p. 2007-18, Jul 1989.

GERL, V. et al. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 7, p. 1370-7, Jul 2010.

GHOSH, D. K.; ABU-SOUD, H. M.; STUEHR, D. J. Domains of macrophage N(O) synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. **Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1444-9, Feb 6 1996.

GORALSKI, K. B. et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 38, p. 28175-88, Sep 21 2007.

GRAHAM, K. L. et al. Chemokine-like receptor-1 expression by central nervous system-infiltrating leukocytes and involvement in a model of autoimmune demyelinating disease. **J Immunol**, v. 183, n. 10, p. 6717-23, Nov 15 2009.

HAUSMAN, D. B. et al. The biology of white adipocyte proliferation. **Obes Rev**, v. 2, n. 4, p. 239-54, Nov 2001.

HEMMENS, B. et al. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 46, p. 35786-91, Nov 17 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24 Suppl 4, p. S23-7, Nov 2000.

HUBERT, H. B. et al. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 67, n. 5, p. 968-77, May 1983.

IANNONE, F.; LAPADULA, G. Chemerin/ChemR23 pathway: a system beyond chemokines. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 2, p. 104, 2011.

IGNARRO, L. J.; CECH, S. Y. Bidirectional regulation of lysosomal enzyme secretion and phagocytosis in human neutrophils by guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 151, n. 3, p. 448-52, Mar 1976.

IVEY, M. E.; OSMAN, N.; LITTLE, P. J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 199, n. 2, p. 237-47, Aug 2008.

KAUR, J. et al. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 4, p. 1762-8, Jan 22 2010.

KAWANO, Y.; YOSHIMURA, T.; KAIBUCHI, K. Smooth muscle contraction by small GTPase Rho. **Nagoya journal of medical science**, v. 65, n. 1-2, p. 1-8, May 2002.

KEANEY, J. F., JR. et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 3, p. 434-9, Mar 1 2003.

KLATT, P. et al. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. **The EMBO journal**, v. 14, n. 15, p. 3687-95, Aug 1 1995.

KOUGIAS, P. et al. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. **J Surg Res**, v. 126, n. 1, p. 121-9, Jun 1 2005.

KUKLA, M. et al. Chemerin, vaspin and insulin resistance in chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 17, n. 9, p. 661-7, Sep 2010.

KUKLA, M. et al. Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 45, n. 2, p. 235-42, 2010.

KUTZLEB, C. et al. Discovery of novel regulatory peptides by reverse pharmacology: spotlight on chemerin and the RF-amide peptides metastin and QRFP. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 3, p. 265-78, Jun 2005.

KUZKAYA, N. et al. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 25, p. 22546-54, Jun 20 2003.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 8, p. 1201-9, Apr 2003.

LARSSON, B. et al. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. **Br Med J (Clin Res Ed)**, v. 288, n. 6428, p. 1401-4, May 12 1984.

LIU, Y.; GUTTERMAN, D. D. Oxidative stress and potassium channel function. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 29, n. 4, p. 305-11, Apr 2002.

LIU, Y.; SHEPHERD, E. G.; NELIN, L. D. MAPK phosphatases--regulating the immune response. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 3, p. 202-12, Mar 2007.

LUANGSAY, S. et al. 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**, v. 183, n. 10, p. 6489-99, Nov 15 2009.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231-4, Jun 15 1993.

MATHER, K. J. et al. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 12, p. 3517-23, Dec 2002.

MATZ, R. L. et al. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. **British journal of pharmacology**, v. 131, n. 2, p. 303-11, Sep 2000.

MAY, L. T.; CHRISTOPOULOS, A. Allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. **Current opinion in pharmacology**, v. 3, n. 5, p. 551-6, Oct 2003.

MILLER, R. T. et al. Involvement of the reductase domain of neuronal nitric oxide synthase in superoxide anion production. **Biochemistry**, v. 36, n. 49, p. 15277-84, Dec 9 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British journal of pharmacology**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan 2006.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 13, p. 2495-501, Jul 1 1988.

NAKAMURA, M. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha on basal and stimulated endothelium-dependent vasomotion in human resistance vessel. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 487-92, Oct 2000.

NOLL, G.; WENZEL, R. R.; LUSCHER, T. F. Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 157, n. 1-2, p. 259-67, Apr 12-26 1996.

OLIVER, F. J. et al. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23251-6, Dec 5 1991.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, Jun 11-17 1987.

PAROLINI, S. et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 3625-32, May 1 2007.

PEREIRA, A. C.; OLIVON, V. C.; DE OLIVEIRA, A. M. Impaired calcium influx despite hyper-reactivity in contralateral carotid following balloon injury: eNOS involvement. **European journal of pharmacology**, v. 642, n. 1-3, p. 121-7, Sep 10 2010.

PERTICONE, F. et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 159-65, Jan 2001.

PETERS, K. et al. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. **Cardiovascular research**, v. 60, n. 1, p. 49-57, Oct 15 2003.

PIERCE, G. L. et al. Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults. **Hypertension**, v. 52, n. 1, p. 72-9, Jul 2008.

RADDATZ, R.; SCHAFFHAUSER, H.; MARINO, M. J. Allosteric approaches to the targeting of G-protein-coupled receptors for novel drug discovery: a critical assessment. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 383-91, Aug 1 2007.

RAMAN, C. S. et al. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. **Cell**, v. 95, n. 7, p. 939-50, Dec 23 1998.

ROH, S. G. et al. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 362, n. 4, p. 1013-8, Nov 3 2007.

ROMAN, A. A.; PARLEE, S. D.; SINAL, C. J. Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. **Endocrine**, May 19 2012.

SANCHEZ-MUNOZ, F. et al. [Adipocytokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells]. **Gaceta medica de Mexico**, v. 141, n. 6, p. 505-12, Nov-Dec 2005.

SCHERER, E. Q.; HERZOG, M.; WANGEMANN, P. Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by rho-kinase-induced Ca(2+) sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related Peptide. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 33, n. 12, p. 2965-71, Dec 2002.

SCOTT-BURDEN, T. Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin. **Circulation**, v. 91, n. 1, p. 248-50, Jan 1 1995.

SEKO, T. et al. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. **Circulation research**, v. 92, n. 4, p. 411-8, Mar 7 2003.

SELL, H. et al. 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**, v. 95, n. 6, p. 2892-6, Jun 2010.

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**, v. 68, n. 4, p. 378-84, Nov 2009.

SELL, H. et al. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2731-40, Dec 2009.

SHULDINER, A. R.; YANG, R.; GONG, D. W. Resistin, obesity and insulin resistance--the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 18, p. 1345-6, Nov 1 2001.

SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice**, v. 13, n. 2, p. 277-96, 1991.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of physiology**, v. 522 Pt 2, p. 177-85, Jan 15 2000.

SPIROGLOU, S. G. et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**, v. 17, n. 2, p. 115-30, Feb 26 2010.

SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 6, p. 539-52, Sep 15 2009.

STEJSKAL, D. et al. Chemerin is an independent marker of the metabolic syndrome in a Caucasian population--a pilot study. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 152, n. 2, p. 217-21, Dec 2008.

STEWART, K. G.; ZHANG, Y.; DAVIDGE, S. T. Aging increases PGHS-2-dependent vasoconstriction in rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1242-7, Jun 2000.

STROES, E. et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 1, p. 41-6, Jan 1 1997.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14533-6, May 4 2001.

STUEHR, D. J.; GRIFFITH, O. W. Mammalian nitric oxide synthases. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 65, p. 287-346, 1992.

TAKAHASHI, M. et al. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **FEBS Lett**, v. 582, n. 5, p. 573-8, Mar 5 2008.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation research**, v. 88, n. 9, p. 877-87, May 11 2001.

TESAURO, M.; CARDILLO, C. Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. **Acta physiologica**, v. 203, n. 1, p. 279-86, Sep 2011.

TOPAL, G. et al. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. **Free radical biology & medicine**, v. 36, n. 12, p. 1532-41, Jun 15 2004.

TZENG, E. et al. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 25, p. 11771-5, Dec 5 1995.

UBBINK, J. B. et al. Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia. **The American journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 1, p. 47-53, Jan 1993.

UEHATA, M. et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-4, Oct 30 1997.

URACZ, W. et al. Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 53, n. 4 Pt 1, p. 643-54, Dec 2002.

VASQUEZ-VIVAR, J. et al. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. **The Biochemical journal**, v. 362, n. Pt 3, p. 733-9, Mar 15 2002.

VENEMA, R. C. et al. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 2, p. 1276-82, Jan 10 1997.

VERLOHREN, S. et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 271-6, Sep 2004.

VILA, E.; SALAICES, M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 3, p. H1016-21, Mar 2005.

VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 12, n. 2, p. 181-7, Mar 2003.

WEIGERT, J. et al. Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 16, n. 4, p. 630-7, Apr 2010.

- WEIL, B. R. et al. Enhanced endothelin-1 system activity with overweight and obesity. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 301, n. 3, p. H689-95, Sep 2011.
- WENZEL, P. et al. Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 1, p. 65-76, May 2008.
- WHITE, L. R. et al. Cytokine enhancement of endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. **Eur J Pharmacol**, v. 406, n. 1, p. 117-22, Oct 6 2000.
- WITTAMER, V. et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. **J Exp Med**, v. 198, n. 7, p. 977-85, Oct 6 2003.
- WITTAMER, V. et al. The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 9956-62, Mar 12 2004.
- YAMAWAKI, H. Mechanisms of action of novel adipocytokines on the vascular system. **Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica**, v. 137, n. 3, p. 131-5, Mar 2011a.
- YAMAWAKI, H. Vascular effects of novel adipocytokines: focus on vascular contractility and inflammatory responses. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 3, p. 307-10, Mar 2011b.
- YAMAWAKI, H. et al. A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, May 24 2012.
- YOSHIMURA, T.; OPPENHEIM, J. J. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. **Exp Cell Res**, v. 317, n. 5, p. 674-84, Mar 10 2011.
- ZABEL, B. A. et al. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34661-6, Oct 14 2005.
- ZABEL, B. A.; SILVERIO, A. M.; BUTCHER, E. C. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. **J Immunol**, v. 174, n. 1, p. 244-51, Jan 1 2005.
- ZICCARDI, P. et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 804-9, Feb 19 2002.
- ZOU, M. H.; SHI, C.; COHEN, R. A. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. **The Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 6, p. 817-26, Mar 2002.

ZUBKOV, A. Y. et al. Mechanism of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 31, n. 2, p. 526-33, Feb 2000.

8. ANEXO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1295.53.7) intitulado: "Efeito da Adipocina *Chemérin* sobre a Reatividade Vascular: análise em aorta de ratos", de autoria de **Karla Bianca Neves** e de **Ana Maria de Oliveira**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus de Ribeirão Preto – USP* foi aprovado em reunião da CEUA de 02.02.2011.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1295.53.7), entitled: "Effects of the adipokine chemerin on the vascular reactivity: analysis in rat aorta" 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, February 02, 2011

Ribeirão Preto, 4 de fevereiro de 2011

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro