

Novo Efeito Cardioprotetor da L-Carnitina em Camundongos Obesos Diabéticos: Regulação da Expressão de Quemerina e CMKLR1 no Coração e Tecidos Adiposos

Novel Cardioprotective Effect of L-Carnitine on Obese Diabetic Mice: Regulation of Chemerin and CMKLR1 Expression in Heart and Adipose Tissues

Rezvan Amiri,¹ Mohammad Reza Tabandeh,¹ Seyed Ahmad Hosseini²

Department of Basic Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz,¹ Ahvaz – Irã

Department of Nutrition Science, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences,² Ahvaz – Irã

Resumo

Fundamentos: A L-carnitina (LC) tem muitos efeitos benéficos em animais diabéticos e humanos, mas seu efeito regulatório sobre a quemerina como uma citocina inflamatória e seu receptor no estado diabético são desconhecidos.

Objetivos: O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito regulatório da LC na expressão do receptor semelhante ao de quimiocina 1 e quemerina (CMKLR1) em tecidos adiposo e cardíaco de camundongos diabéticos.

Métodos: Sessenta camundongos NMARI foram divididos em quatro grupos, incluindo controle, diabético, diabético + suplementação com LC e controle + suplementação com LC. O diabetes foi induzido pela alimentação dos animais com dieta hipercalórica por 5 semanas e injeção de estreptozotocina. Os animais foram tratados com 300 mg/kg de LC por 28 dias. Nos dias 7, 14 e 28 após o tratamento, os níveis de mRNA e proteína da quemerina e CMKLR1 nos tecidos cardíacos e adiposos de animais foram determinados utilizando análise por qPCR e ELISA. Os índices de resistência à insulina também foram medidos em todos os grupos experimentais. A diferença com $p < 0,05$ foi considerada significativa.

Resultados: A expressão de quemerina e CMKLR1 aumentou nos tecidos cardíaco e adiposo de camundongos diabéticos nos dias 14 e 28 após a indução do diabetes, concomitantemente com a incidência de resistência à insulina e níveis aumentados de quemerina circulante ($p < 0,05$). O tratamento com LC causou uma diminuição significativa na expressão de ambos os genes nos tecidos estudados e redução dos sintomas de resistência à insulina e dos níveis séricos de quemerina ($p < 0,05$).

Conclusão: Os resultados sugerem que o tratamento com LC pode diminuir a expressão de quemerina e CKLR1 em tecidos cardíacos e adiposos de animais experimentais obesos e diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Carnitina; Quimiocinas.

Abstract

Background: L-carnitine (LC) has many beneficial effects on diabetic animals and humans, but its regulatory effect on chemerin as an inflammatory cytokine, and its receptor in diabetes status is unknown.

Objectives: The present study aimed to investigate the regulatory effect of LC on the expression of chemerin and chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) in adipose and cardiac tissues of diabetic mice.

Methods: Sixty NMARI mice were divided into four groups including control, diabetic, diabetic + LC supplementation and control + LC supplementation. Diabetes was induced by feeding the animals a high-calorie diet for 5 weeks and injection of Streptozotocin. The animals were treated with 300 mg/kg LC for 28 days. On days 7, 14, and 28 after treatment, the mRNA and protein levels of chemerin and CMKLR1 in the cardiac and adipose tissues of the animals were determined using qPCR analysis and ELISA. Insulin resistance indices were also measured in all experimental groups. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results: Chemerin and CMKLR1 expression levels were increased in cardiac and adipose tissues of diabetic mice on days 14 and 28 after diabetes induction, concurrent with the incidence of insulin resistance and increased levels of circulating chemerin ($p < 0.05$). The treatment with LC caused a significant decrease in the expression of both genes in studied tissues and the reduction of insulin resistance symptoms and serum chemerin levels ($p < 0.05$).

Conclusion: The results suggest that LC treatment were able to downregulate the expression of chemerin and CKLR1 in cardiac and adipose tissues of obese, diabetic experimental animals.

Keywords: Diabetes Mellitus; Carnitine; Chemokines.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Mohammad Reza Tabandeh •

Department of Basic Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, 61355-145, Ahvaz, Irã

E-mail: m.tabandeh@scu.ac.ir

Artigo recebido em 25/01/2020, revisado em 14/08/2020, aceito em 30/09/2020

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20200044>

Introdução

Um número crescente de evidências tem mostrado a existência de uma relação bioquímica e molecular complexa e multifacetada entre diabetes mellitus (DM), obesidade e doenças cardiovasculares (DCV).¹ Um possível mecanismo que liga DM e obesidade com DCV subsequentes é a inflamação de baixo grau em tecido adiposo.² O tecido adiposo de animais ou humanos com DM e resistência à insulina secreta uma variedade de citocinas ou adipocinas. A secreção anormal dessas adipocinas contribui para o aumento da inflamação e do acúmulo de lipídeos e pode levar ao desenvolvimento de disfunção endotelial e miocárdica e cardiomiopatias.^{2,3} As alterações de expressão ou secreção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em cardiomiócitos e tecido adiposo têm sido implicadas na patogênese da síndrome metabólica e DCV em animais ou humanos obesos.²

A quemerina é uma adipocina recentemente identificada que atua como uma proteína quimioatrativa e medeia seus efeitos através de um receptor acoplado à proteína G, o receptor semelhante ao de quimiocina 1 (CMKLR1, do inglês *chemokine like receptor 1*), também conhecido como ChemR23.⁴⁻⁷ Estudos anteriores demonstraram que a quemerina tinha um papel em várias patologias cardiovasculares, incluindo o desenvolvimento de hipertensão, progressão de lesões ateroscleróticas e função cardíaca prejudicada em pacientes com cardiomiopatia dilatada.⁸ A quemerina pode causar inflamação endotelial e induzir apoptose em cardiomiócitos murinos, demonstrando o seu papel potencial nas disfunções dos cardiomiócitos.^{9,10}

Recentemente, nutrientes que têm como alvo as mitocôndrias, como o ácido lipóico, a L-carnitina (LC), a nicotinamida e a biotina, receberam maior atenção na melhora das complicações cardiovasculares e inflamatórias relacionadas ao diabetes.^{11,12} A L-carnitina (LC) é condicionalmente um nutriente essencial que facilita o transporte do ácido graxo para os locais de oxidação na mitocôndria.^{13,14}

Há evidências crescentes de que a suplementação de LC pode ser benéfica no tratamento da resistência à insulina e distúrbios metabólicos relacionados à obesidade em pacientes diabéticos.¹¹ Vários estudos têm demonstrado que a LC tem efeitos benéficos na prevenção e melhora de doenças cardiovasculares, incluindo insuficiência cardíaca crônica, infarto agudo do miocárdio anterior, doença arterial coronariana, remodelação miocárdica e fibrilação atrial.^{12,14} Vários mecanismos têm sido relatados sobre o papel protetor da LC nas células cardíacas sob condição hiperglicêmica, incluindo melhora da homeostase da energia cardíaca, atenuação do estresse oxidativo e dano celular hipóxico e redução da apoptose.^{15,16} Evidências limitadas também mostraram que a LC pode afetar a concentração sérica de quemerina em crianças obesas.¹⁷ Com base em nosso conhecimento, poucos estudos focaram no papel da suplementação de LC na regulação da expressão de quemerina, em particular nos tecidos cardíacos e adiposos de animais diabéticos. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação de LC na expressão de quemerina e CMKLR1 em tecido adiposo e tecido cardíaco de um modelo experimental de obesidade e diabetes induzidos por dieta hipercalórica em camundongos.

Materiais e métodos

Animais

Sessenta camundongos NMARI machos (25 ± 2 g) foram selecionados do centro de animais de laboratório da faculdade de medicina veterinária da Shahid Chamran University de Ahvaz, Irã. Todos os camundongos foram mantidos em condições ambientais controladas, com temperatura média de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de luz e escuridão de 12:12 horas, com livre acesso a água e dieta especial de camundongos preparada em pellets (Pars, Teerã, Irã). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética para pesquisa em animais e humanos da Shahid Chamran University de Ahvaz (EE/98.24.3.26209/SCU.AC.IR). O trabalho com os camundongos foi realizado com base nas diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório (publicação NIH nº 86-23). Eles foram aclimatados por 7 dias antes do início do experimento.

Desenho experimental

Os animais ($n = 60$) foram divididos de forma aleatória em quatro grupos igualmente. A randomização foi realizada por meio da alocação de animais do mesmo sexo, idade e peso em diferentes grupos experimentais através de tabelas de números aleatórios. Dois grupos foram alimentados com dieta rica em energia, preparada com adição de 20% de sacarose (p/p) e 10% de banha (p/p) nas dietas por 5 semanas e descritas como tendo alto teor de gordura/hipercalóricas (HF/HC) ($n = 30$), enquanto os demais continuaram a consumir dietas normais pelo mesmo período, servindo como grupo controle ($n = 30$). Após 5 semanas de alimentação com dietas HF/HC, os grupos diabéticos foram tratados com uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma, Alemanha) (30 mg/kg de peso corporal) preparada em solução tampão de citrato.^{18,19}

A glicose foi medida cinco dias após o tratamento com STZ utilizando um glicosímetro portátil (Medisign, China), e a incidência de diabetes foi confirmada se a glicose sérica estivesse acima de 6,5 mmol/L e o índice HOMA-IR estivesse aumentado em comparação com o grupo de controle.²⁰ O dia seguinte após a confirmação do diabetes foi considerado o dia 0 do tratamento com LC. Um grupo diabético foi tratado com LC na dose de 300 mg/kg ($n = 15$) em água potável concomitante com a dieta HF/HC por 28 dias, enquanto outro grupo diabético ($n = 15$) (controle diabético) foi alimentado apenas com a dieta HF/HC pelo mesmo período.^{18,19} Também foram considerados um grupo controle ($n = 15$) que recebeu dieta normal e outro grupo controle ($n = 15$) (controle tratado com LC) que consumiu LC na dose de 300 mg/kg em água potável por 28 dias.

Amostragem

A eutanásia dos animais foi realizada com uma combinação de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), respectivamente, nos dias 0, 14 e 28 após o tratamento com LC. Amostras de sangue foram coletadas e os soros separados e armazenados a -20°C para utilização. O coração e o tecido adiposo visceral foram separados e mantidos a -70°C até a sua utilização.

Medidas de parâmetros bioquímicos

Os níveis séricos de insulina e quemerina foram determinados com os kits ELISA específicos para a espécie (EastBiopharm, China). A glicose sérica foi medida com kits comerciais (PishtazTeb, Irã) de acordo com a recomendação do fabricante. As concentrações séricas de IL1- β e TNF- α foram determinadas utilizando kits ELISA específicos para a espécie, conforme recomendado pelo fabricante (Biovision Inc. EUA)

Estimativa de HOMA - IR

O índice HOMA-IR foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

Índice HOMA = Insulina em jejum (μ U/ml) \times Glicose em jejum (mmol/L)/22,5. Valores crescentes e decrescentes de HOMA-IR em relação ao controle, animais saudáveis indicam aumento e diminuição na sensibilidade à insulina, respectivamente.²⁰

Isolamento de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de 100 mg de coração e tecidos adiposos utilizando o reagente de isolamento RNX[®] de acordo com o procedimento do fabricante (SinaClon, Teerã, Irã). As amostras foram tratadas com a enzima DNase I para evitar contaminação do DNA. A pureza do RNA na razão 260/280 OD e a integridade do RNA foram avaliadas com uma célula de medição de microvolume em Eppendorf μ Cuvette G1.0 (Eppendorf BioPhotometer D30, Eppendorf, Alemanha). A transcrição reversa foi realizada com o kit de síntese de cDNA YTA (Yekta tajhiz, Irã) e Eppendorf Thermal Cycler (Alemanha) utilizando 1 μ g de RNA e hexâmero aleatório, conforme recomendado pelo fabricante.

PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real foi realizada utilizando o sistema de detecção Roche Light-Cycler (Basel, Suíça) pelo qPCR[®] Green Master Kit para SYBR Green I[®] (Yekatajehiz, Irã). O nível de expressão relativa dos transcritos de quemerina e CMKLRI foram comparados com os de camundongos GAPDH como gene *housekeeping*. Os conjuntos específicos de primers (Pishgam BioTech, Co, Teerã, Irã) projetados para este estudo foram: quemerina (GenBank:NC-007299): 5'- TCTTACCTACGACCAGTATCAG -3' e 5'- ACATTATCTGCATAGACCCCATG -3' e CMKLRI (GenBank:NM-008153.3): 5'- GTACGACGCTTACAACGACT -3' e 5'- GCACACCAAGCTGTAGATCA -3', GAPDH (GenBank:NM-001034055): 5'- CTCATCTACCTCCATCGTCTG -3' e 5'- CCTGCTCTGTGCTGCCGGTGCTG -3'. O protocolo de PCR utilizado consistiu em uma desnaturação de 5 min a 94°C, seguida por 45 ciclos de 94°C por 15 s, 60°C por 30 s. Duas reações separadas sem cDNA ou com RNA foram realizadas em paralelo como controles. A quantificação relativa foi realizada de acordo com o método comparativo 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} utilizando o software Lightcycler 96[®]. A validação do ensaio para verificar se os primers para quemerina e CMKLRI e GAPDH apresentavam eficiências de amplificação semelhantes foi realizada conforme descrito anteriormente. Todas as análises por qPCR foram realizadas de acordo com a diretriz *The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE).²¹

Determinação da proteína quemerina tecidual

Os tecidos cardíacos e adiposos foram homogeneizados em 500 μ L de tampão de lise RIPA (NaCl; 150 mM, SDS 0,1%, Tris; 25 mM, pH 7,4, NaF; 1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM) com um homogeneizador (Heidolph, Schwabach, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 10.000 \times RPM por 15 min a 4°C (Centrífuga 5415 R; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70°C para análise subsequente. A concentração de proteína do sobrenadante foi estimada com o método de Bradford. A concentração de quemerina foi determinada utilizando os kits ELISA específicos para a espécie (EastBiopharm, China) e expressa como ng/mg de proteína tecidual.

Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o software SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os testes de Shapiro-Wilk ou Levene foram utilizados para determinar a normalidade dos dados ou igualdade das variâncias dos erros. Todos os parâmetros foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de três vias com tempos de amostragem, tratamento com LC e condição diabética como fatores. Quando a interação e/ou os efeitos principais eram significativos, as médias eram comparadas entre os diferentes grupos experimentais em diferentes momentos utilizando o teste *post hoc* de comparação múltipla de Tukey. Os gráficos foram desenhados utilizando o software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Não utilizamos métodos estatísticos para predeterminar o tamanho da amostra. Os tamanhos das amostras foram estimados com base na disponibilidade da amostra, questões éticas sobre a realização de objetivos experimentais sem desperdiçar muitos animais e estudos experimentais anteriores.^{11,16} Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Nossos resultados mostraram que o consumo por 5 semanas de uma dieta hipercalórica concomitante à injeção de baixa dose de STZ induziu um fenótipo de DM2 caracterizado por hiperinsulinemia e hiperglicemia. O efeito dos fatores principais (condição diabética; 2 níveis, tratamento com LC; 2 níveis e tempo de amostragem; 3 níveis) e sua interação em cada variável são mostrados na tabela 1. Uma análise ANOVA de três vias indicou um efeito principal do tempo de amostragem ($p = 0,0031$), tratamento com LC ($p = 0,0001$), condição diabética ($p = 0,0001$) e interação do tempo de amostragem \times tratamento LC \times condição diabética ($p = 0,0018$) no nível de insulina em diferentes grupos experimentais (Tabela 1). As alterações nos níveis de insulina no soro em camundongos diabéticos tratados com LC são mostradas na Figura 1A. O nível sérico de insulina aumentou significativamente no dia 7 após a indução do diabetes (dia 0 do tratamento com LC) em relação aos animais controle saudáveis e permaneceu elevado até o dia 28 do experimento ($p < 0,05$). O nível sérico de insulina diminuiu de forma significativa em camundongos diabéticos após duas e

quatro semanas de tratamento com LC em comparação com camundongos diabéticos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 1A). O tratamento de camundongos diabéticos com LC por mais tempo, entre 14 e 28 dias de tratamento, não foi mais eficaz na redução do nível de insulina ($p > 0,05$) (Figura 1A).

Uma análise ANOVA de três vias indicou um efeito principal do tempo de amostragem ($p = 0,0002$), tratamento com LC ($p = 0,0005$), condição diabética ($p = 0,0002$) e interação do tempo de amostragem \times tratamento com LC \times condição diabética ($p = 0,0002$) na concentração de glicose sérica em diferentes grupos experimentais. O nível de glicose sérica foi significativamente maior em camundongos diabéticos nos dias 14 e 28 após a indução do diabetes em comparação com animais saudáveis ($p < 0,05$), enquanto a administração de dieta suplementada com HF/HC e injeção de STZ não apresentou efeito significativo no nível de glicose sérica durante a primeira semana de indução experimental do diabetes ($p > 0,05$) (Figura 1B). Observou-se que o tratamento de camundongos diabéticos com LC resultou em redução significativa do açúcar no sangue, conforme observado nos dias 14 e 28, em comparação com camundongos diabéticos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 1B). A ingestão de LC não teve um efeito evidente no nível de glicose sérica em camundongos saudáveis ($p > 0,05$) (Figura 1B).

Uma análise ANOVA de três vias indicou um efeito principal do tempo de amostragem ($p = 0,0019$), tratamento com LC ($p = 0,0017$), condição diabética ($p = 0,0005$) e interação do tempo de amostragem \times tratamento LC \times condição diabética ($p = 0,0015$) no índice HOMA-IR em diferentes grupos experimentais. O índice HOMA-IR em animais diabéticos aumentou significativamente no 14^o e 28^o dias do período experimental em relação aos camundongos saudáveis ($p < 0,05$), enquanto não

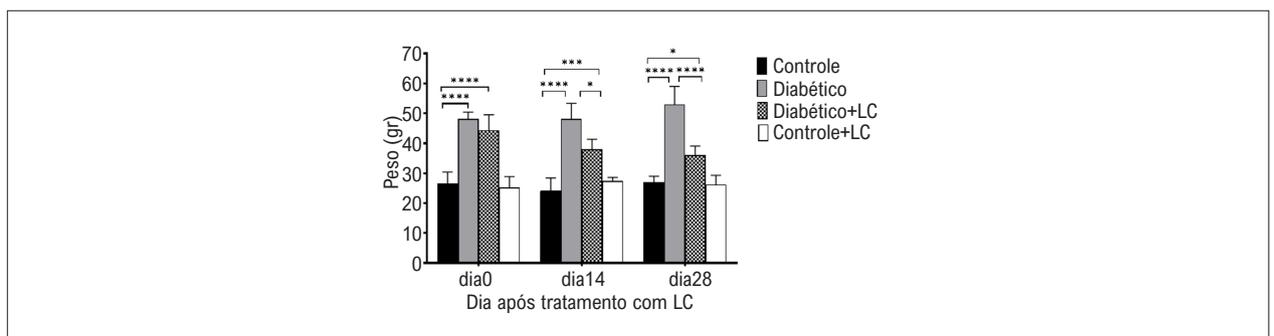
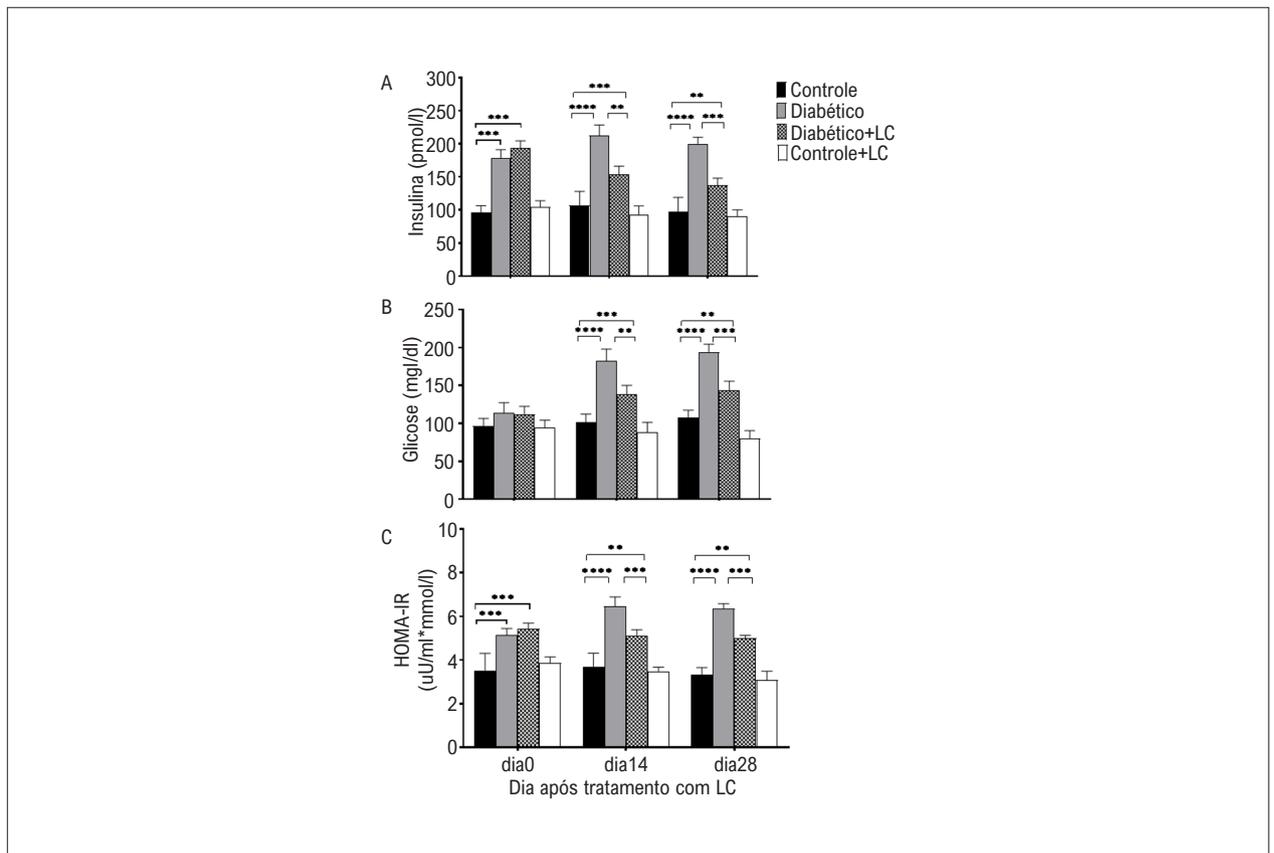
apresentou alteração significativa na primeira semana após a indução experimental do diabetes ($p > 0,05$) (Figura 1C). A administração oral de LC teve efeito de redução significativa no índice HOMA-IR nos dias 14 e 28 do período experimental em camundongos diabéticos ($p < 0,05$) (Figura 1C). Como mostrado na Figura 2, foi observado maior peso corporal em camundongos que receberam dieta suplementada com HF/HC em todos os momentos do experimento em comparação com camundongos saudáveis ($p < 0,05$). Durante as quatro semanas de observação dos camundongos diabéticos tratados com LC, houve uma perda de peso, em relação ao dia 0, ou seja, antes do início do tratamento ($p < 0,05$) (Figura 2).

Em relação à concentração de quemerina sérica, uma ANOVA de três vias mostrou um efeito principal do tempo de amostragem ($p = 0,0003$), tratamento com LC ($p = 0,0005$), condição diabética ($p = 0,0003$) e interação do tempo de amostragem \times tratamento LC \times condição diabética ($p = 0,0003$). Nossos resultados mostraram que os níveis séricos de quemerina foram significativamente maiores no grupo diabético do que no grupo controle em todos os momentos de amostragem, com o nível mais alto no dia 28 do experimento ($p < 0,05$). Duas semanas após o tratamento com LC, o nível de quemerina sérica de camundongos diabéticos não mostrou diferença significativa com o de camundongos diabéticos não tratados ($p > 0,05$), enquanto um efeito de redução significativa no nível de quemerina sérica foi observado quando camundongos diabéticos consumiram LC por 28 dias ($p < 0,05$) (Figura 3).

Em relação aos níveis de quemerina do músculo cardíaco e de mRNA do CMKLR1, uma ANOVA de três vias mostrou um efeito principal do tempo de amostragem (quemerina $p = 0,0001$, CMKLR1 $p = 0,0003$), tratamento com LC

Tabela 1 – Resultados da análise de ANOVA de três vias para determinação dos efeitos da condição diabética (D), tempo de amostragem (TA) e tratamento com LC (LC) e suas interações (D \times TA \times LC) em cada variável

Variável	Fatores principais						Interações dos fatores principais	
	Condição diabética (D)		Tratamento com LC		Tempos de amostragem (TA)		D \times LC \times TA	
	p value	F (1,48)	p value	F (1,48)	p value	F (2,48)	p value	F (2,48)
Insulina	$p = 0,0001$	305,92	$p = 0,0001$	17,41	$p = 0,0031$	4,89	$p = 0,0018$	3,73
Glicose	$p = 0,0002$	6182,2	$p = 0,0005$	1248,2	$p = 0,0002$	634,6	$p = 0,0002$	67,59
HOMA-IR	$p = 0,0005$	447,02	$p = 0,0017$	12,95	$p = 0,0019$	8,12	$p = 0,0015$	8,91
MRNA da quemerina adiposa	$p = 0,0003$	1761,2	$p = 0,0003$	1040,3	$p = 0,0008$	125,45	$p = 0,0007$	319,21
MRNA da quemerina cardíaca	$p = 0,0002$	5546,3	$p = 0,0001$	187,6	$p = 0,0002$	73,36	$p = 0,0002$	67,9
Proteína quemerina adiposa	$p = 0,0002$	2267,2	$p = 0,0002$	762,21	$p = 0,0002$	70,23	$p = 0,0003$	64,22
Proteína quemerina cardíaca	$p = 0,0003$	1651,4	$p = 0,0002$	641,22	$p = 0,0003$	62,27	$p = 0,0004$	64,12
MRNA do CMKLR1 adiposo	$p = 0,0001$	8376,2	$p = 0,0001$	306,99	$p = 0,0001$	96,51	$p = 0,0001$	65,73
MRNA do CMKLR1 cardíaco	$p = 0,0001$	2172,3	$p = 0,0002$	65,04	$p = 0,0003$	75,59	$p = 0,0002$	7,37
Quemerina sérica	$p = 0,0003$	3759,4	$p = 0,0005$	183,59	$p = 0,0003$	423,2	$p = 0,0003$	91,87
IL1- β	$p = 0,0005$	2042,1	$p = 0,0002$	53,12	$p = 0,0004$	375,6	$p = 0,0008$	68,46
TNF- α	$p = 0,0001$	4644,3	$p = 0,0002$	475,6	$p = 0,0002$	2516,2	$p = 0,0002$	439,17



(quemerina, $p = 0,0002$; CMKLR1, $p = 0,0002$), condição diabética (quemerina, $p = 0,0002$; CMKLR1, $p = 0,0001$) e interação entre três fatores (quemerina, $p < 0,0001$; CMKLR1, $p = 0,0002$). Os níveis de mRNA e proteína da quemerina e CMKLR1 no tecido cardíaco de camundongos diabéticos foram maiores do que os dos animais saudáveis em todos os momentos de amostragem após a indução do diabetes ($p < 0,05$) (Figura 4 e Tabela 2). O consumo oral de LC por duas semanas não teve efeito significativo na redução da

expressão da quemerina ou CMKLR1 no tecido cardíaco de camundongos diabéticos ($p > 0,05$), enquanto 28 dias após o tratamento com LC a expressão dos genes estudados foi reduzida no tecido cardíaco de camundongos diabéticos em comparação com os animais diabéticos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 4, Tabela 2).

Em relação à quemerina adiposa e níveis de mRNA e proteína de CMKLR1, uma ANOVA de três vias mostrou um efeito principal do tempo de amostragem (quemerina,

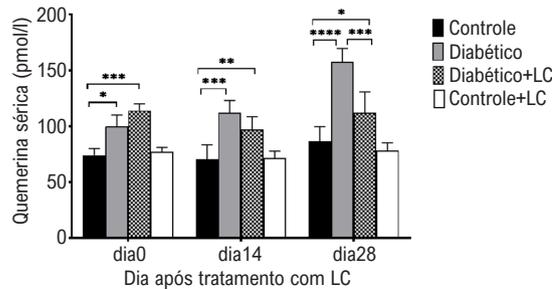


Figura 3 – Níveis séricos de quemerina em diferentes grupos experimentais nos dias 0, 14 e 28 após o tratamento com LC. Os dados são médias \pm DP. O nível de significância entre os grupos em cada momento de amostragem foi estabelecido em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

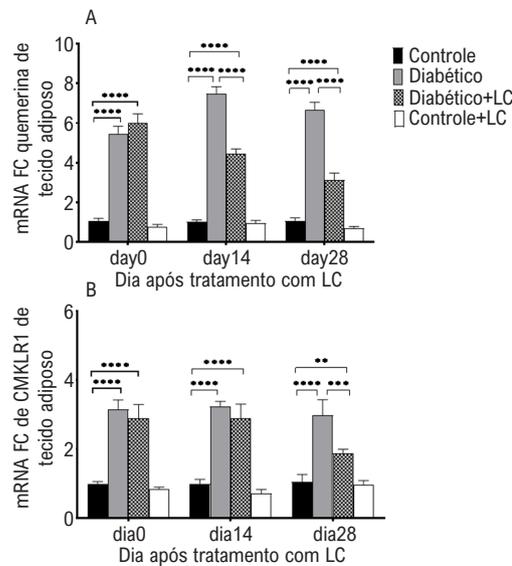


Figura 4 – Níveis de expressão gênica de quemerina (A) e CMKLR1 (B) no tecido adiposo de diferentes grupos experimentais nos dias 0, 14 e 28 após o tratamento com LC. O método qRT-PCR foi utilizado para análise da expressão relativa dos genes estudados. GAPDH foi utilizado como gene de housekeeping. O nível de significância entre os grupos em cada momento de amostragem foi estabelecido em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Tabela 2 – Nível de quemerina no tecido cardíaco dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média \pm DP. Letras minúsculas diferentes (a, b) demonstram diferenças significativas entre os grupos em cada dia do experimento ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes (A, B) demonstram diferenças significativas entre os tempos de tratamento em cada grupo ($p < 0,05$)

	Nível de quemerina no tecido cardíaco (ng/mg proteína)		
	Dia após o tratamento com LC		
	0	14	28
Controle	2,47 \pm 0,42 ^{aA}	2,56 \pm 0,27 ^{aA}	2,27 \pm 0,22 ^{aA}
Diabético	3,01 \pm 0,31 ^{aA}	4,97 \pm 0,48 ^{bB}	5,51 \pm 0,41 ^{bB}
Diabético + LC	2,81 \pm 0,16 ^{aA}	4,42 \pm 0,38 ^{bB}	3,13 \pm 0,29 ^{aA}
Controle + LC	2,32 \pm 0,38 ^{aA}	2,67 \pm 0,33 ^{aA}	2,37 \pm 0,28 ^{aA}

LC: L-carnitina.

$p = 0,0008$; CMKLR1 $p = 0,0001$), tratamento com LC (quemerina, $p = 0,0003$; CMKLR1, $p = 0,0001$), condição diabética (quemerina, $p = 0,0003$; CMKLR1 $p = 0,0001$) e interação entre os três fatores (quemerina, $p = 0,0007$; CMKLR1, $p = 0,0001$). Observou-se que os animais que receberam dieta suplementada com HF/HC apresentaram níveis maiores de proteína e de mRNA de quemerina e CMKLR1 no tecido adiposo no 7º, 14º e 28º dias após a alimentação final em comparação com os animais que receberam dieta normal ($p < 0,05$) (Figura 5 A-B, Tabela 3). O tratamento de camundongos diabéticos com LC por 14 ou 28 dias resultou em uma redução significativa dos níveis de proteína quemerina e mRNA no tecido adiposo de animais diabéticos quando comparados com camundongos diabéticos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 5A, Tabela 2). Os animais que receberam LC por 14 dias não apresentaram alteração significativa na expressão de CMKLR1 ($p > 0,05$), enquanto aqueles que foram tratados com LC por 28 dias apresentaram menor expressão de CMKLR1 quando comparados com camundongos diabéticos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 5B).

Em relação à concentração sérica de IL1- β e TNF- α , uma ANOVA de três vias mostrou um efeito principal do tempo de amostragem (IL1- β , $p = 0,0004$ e TNF- α , $p = 0,0002$), tratamento (IL1- β , $p = 0,0002$ e TNF- α , $p = 0,0002$), condição diabética (IL1- β ; $p = 0,0005$, TNF- α $p = 0,0001$) e interação entre três fatores (IL1- β , $p = 0,0008$; TNF- α , $p = 0,0002$). Os níveis séricos de IL1- β e TNF- α aumentaram significativamente no grupo diabético em comparação com o grupo controle nos dias 14 e 28 após a indução do diabetes ($p < 0,05$) (Tabelas 4 e 5). O tratamento de camundongos

diabéticos com LC por 14 dias não teve efeitos significativos nos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α em comparação com camundongos diabéticos não tratados ($p > 0,05$). No entanto, quatro semanas após o tratamento com LC, as concentrações séricas de ambos os fatores inflamatórios foram significativamente reduzidas em comparação com camundongos diabéticos não tratados.

Discussão

No presente estudo, foi estudado o efeito da suplementação de LC na expressão de quemerina e seu receptor nos tecidos adiposo e cardíaco de ratos obesos e resistentes à insulina experimentalmente induzidos. De acordo com estudos anteriores em modelo de roedor de diabetes tipo 2, nossos resultados mostraram que o consumo de cinco semanas de dieta suplementada com HF/HC, juntamente com a injeção de uma única dose baixa de STZ em camundongos, resultou em resistência à insulina e obesidade, caracterizada por hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento do índice HOMA-IR e peso corporal.^{16,18,19} Foi observado que a suplementação da dieta com HF/HC por cinco semanas resultou em hiperinsulinemia sem alteração óbvia da glicose sanguínea, enquanto após duas semanas de alimentação com dieta hipercalórica, os animais mostraram sintomas séricos de resistência à insulina, incluindo hiperinsulinemia e hiperglicemia. Esses achados sugerem que as alterações metabólicas séricas induzidas por esse tratamento foram mais semelhantes às do diabetes tipo 2 do que às do diabetes tipo 1.

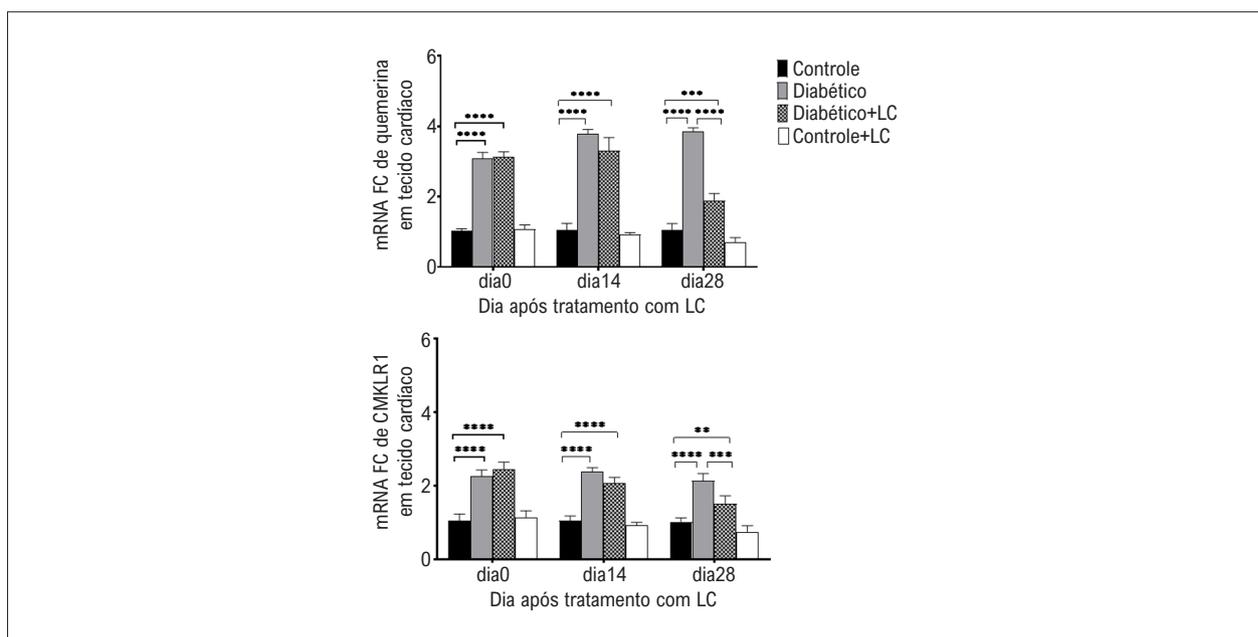


Figura 5 – Níveis de expressão gênica de quemerina (A) e CMKLR1 (B) no tecido cardíaco de diferentes grupos experimentais nos dias 0, 14 e 28 após o tratamento com LC. O método qRT-PCR foi utilizado para análise da expressão relativa dos genes estudados. GAPDH foi utilizado como gene de housekeeping. Os dados são médias \pm DP. O nível de significância entre os grupos em cada momento de amostragem foi estabelecido em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Tabela 3 – Nível de quemerina no tecido adiposo de diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como média ± DP. Letras minúsculas diferentes (a, b) demonstram diferenças significativas entre os grupos em cada dia do experimento (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes (A, B) demonstram diferenças significativas entre os tempos de tratamento em cada grupo (p <0,05)

Nível de quemerina no tecido adiposo (ng/mg proteína)			
Dia após o tratamento com LC			
	0	14	28
Controle	7,62 ± 2,58 ^{aA}	8,11 ± 1,32 ^{aA}	6,49 ± 1,07 ^{aA}
Diabético	13,22 ± 3,61 ^{ba}	14,78 ± 2,59 ^{ba}	16,72 ± 97 ^{bb}
Diabético + LC	12,64 ± 2,09 ^{ba}	10,36 ± 1,78 ^{cb}	10,97 ± 3,12 ^{bb}
Controle + LC	6,82 ± 1,94 ^{aA}	7,09 ± 2,06 ^{aA}	7,44 ± 1,19 ^{aA}

LC: l-carnitina.

Tabela 4 – Nível sérico de IL1-β em diferentes grupos experimentais. Os dados são apresentados como média ± DP. Letras minúsculas diferentes (a, b) demonstram diferenças significativas entre os grupos em cada dia do experimento (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes (A, B) demonstram diferenças significativas entre os tempos de tratamento em cada grupo (p<0,05). LC: l-carnitina

Nível sérico de TNF-α (pmol/L)			
Dia após o tratamento com LC			
	0	14	28
Controle	0,71 ± 0,19 ^{aA}	0,65 ± 0,10 ^{aA}	0,75 ± 0,09 ^{aA}
Diabético	0,65 ± 0,11 ^{aA}	3,92 ± 0,38 ^{bb}	7,10 ± 0,68 ^{bc}
Diabético + LC	1,33 ± 0,16 ^{ba}	3,34 ± 0,50 ^{bb}	3,94 ± 0,43 ^{cb}
Controle + LC	0,78 ± 0,18 ^{aA}	0,98 ± 0,16 ^{aA}	0,57 ± 0,11 ^{db}

LC: l-carnitina.

Tabela 5 – Nível sérico de TNF-α em diferentes grupos experimentais nos dias 0, 14 e 28 após o tratamento com LC. Os dados são apresentados como média ± DP. Letras minúsculas diferentes (a, b) demonstram diferenças significativas entre os grupos em cada dia do experimento (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes (A, B) demonstram diferenças significativas entre os tempos de tratamento em cada grupo (p<0,05)

Nível sérico de IL1-β (pmol/L)			
Dia após o tratamento com LC			
	0	14	28
Controle	0,93 ± 0,11 ^{aA}	1,02 ± 0,14 ^{aA}	0,89 ± 0,31 ^{aA}
Diabético	1,23 ± 0,33 ^{aA}	2,96 ± 0,12 ^{bb}	5,78 ± 0,21 ^{bb}
Diabético + LC	1,33 ± 0,26 ^{aA}	2,23 ± 0,27 ^{bb}	3,46 ± 0,12 ^{cc}
Controle + LC	1,07 ± 0,24 ^{aA}	0,98 ± 0,19 ^{aA}	0,82 ± 0,41 ^{aA}

LC: l-carnitina.

Nossos resultados mostraram que a expressão de quemerina e seu receptor CMKLR1 nos tecidos adiposo e cardíaco de camundongos diabéticos, aumentou após a indução do diabetes experimental. Também foi observado que animais diabéticos apresentaram maior concentração sérica de quemerina em comparação com animais saudáveis. Esse achado sugere que mudanças simultâneas na quantidade de quemerina e seu receptor no estado diabético exacerba a função desse hormônio nos tecidos-alvo e isso pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento

de distúrbios funcionais dos tecidos adiposo e cardíaco no estado diabético. A maior parte dos dados humanos e de animais suporta uma ligação entre quemerina, obesidade e síndrome metabólica, um grupo de distúrbios metabólicos que aumentam o risco de DCV. De acordo com nossos resultados, estudos em humanos e animais relataram os achados paralelos de que animais obesos e diabéticos têm níveis circulantes elevados de quemerina em comparação com indivíduos ou animais saudáveis ou magros.^{22,23} Vários mecanismos possíveis podem ser aceitos sobre os efeitos do aumento da

expressão de quemerina e CMKLR1 no início e progressão da resistência à insulina em animais diabéticos. Sabe-se agora que a inflamação tem um papel importante na resistência à insulina do tecido adiposo e na disfunção do músculo cardíaco.²⁴ A obesidade está correlacionada a um aumento significativo na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , que podem induzir resistência à insulina e morte celular no músculo cardíaco.^{25,26} Nossos achados mostraram níveis séricos aumentados de IL-1 β e TNF- α após a indução do diabetes. Os níveis séricos de quemerina se correlacionam com os níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6.^{6,7,25} A quemerina também tem efeitos adversos sobre os cardiomiócitos através da indução da caspase 9 e apoptose celular mediada por AKT.¹⁰ Tomados em conjunto, esses dados permitem a conclusão de que a superexpressão observada de quemerina e seu receptor em tecidos adiposos e cardíacos de camundongos diabéticos pode ter um papel importante na progressão da resistência à insulina e disfunções cardíacas no estado diabético.

Nossos resultados mostraram que a administração de LC por 4 semanas pode atenuar a expressão da quemerina e de seu receptor nos tecidos adiposo e cardíaco de camundongos diabéticos. Essas alterações foram associadas à melhora dos sintomas de resistência à insulina e à redução dos níveis séricos de quemerina e de alguns fatores inflamatórios. Em concordância com os resultados do presente estudo, estudos anteriores mostraram que o uso de LC leva ao aumento da sensibilidade geral à insulina e da captação de glicose mediada pela insulina no corpo inteiro em animais ou humanos com diabetes tipo 2.^{16,26} Evidências consideráveis apoiam que o suprimento excessivo de ácidos graxos e a obesidade levam ao acúmulo ectópico de vários metabólitos lipídicos no músculo cardíaco e possivelmente em outros tecidos que são prejudiciais à sinalização da insulina, levando à resistência insulínica.²⁷ As células do músculo cardíaco não podem sintetizar LC *de novo* e devem obter a LC de forma exógena através da carnitina/transportador de cátions orgânicos 2.²⁸ Com base nesses achados, sugerimos que a suplementação de LC na dieta pode restaurar o *pool* de LC e reduzir os metabólitos lipídicos e a lipotoxicidade nos tecidos cardíaco e adiposo.

Com base em nosso conhecimento, os efeitos da LC no nível sistêmico de quemerina ou sua expressão no tecido cardíaco de animais ou humanos com diabetes não foram investigados até o momento. Nossos resultados, pela primeira vez, mostraram que os níveis de proteína e mRNA da quemerina e seu receptor eram reduzidos no tecido cardíaco de camundongos diabéticos, concomitantemente ao aumento da sensibilidade à insulina em todo o corpo. Achados anteriores mostraram que os níveis de mRNA e proteína da quemerina estavam elevados no tecido adiposo epicárdico de pacientes com doença arterial coronariana.²⁹ O nível sérico de quemerina também está elevado em pacientes com doença arterial coronariana e correlacionado com a gravidade e extensão da estenose coronariana e vários parâmetros cardiometabólicos.³⁰ Foi observado que a quemerina aumenta a apoptose e a atividade da caspase 9 em cardiomiócitos

murinos e melhora os parâmetros cardioprotetores no coração de rato perfundido isolado.^{10,31} O tratamento com quemerina também altera o destino das células mioblásticas, da miogênese para a adipogênese, que é caracterizada pelo aumento dos níveis de ERO e do conteúdo de TG das células tratadas.³² Tomados em conjunto, concluiu-se que a redução da expressão da quemerina e de seu receptor no tecido cardíaco de camundongos diabéticos após o tratamento com LC pode atenuar o efeito adverso da quemerina nos cardiomiócitos em animais diabéticos. Mais estudos são necessários para confirmar esta opinião.

Embora os resultados do presente estudo tenham mostrado que o tratamento com LC pode atenuar o aumento da expressão da quemerina nos tecidos-alvo, os mecanismos moleculares que regulam sua expressão permanecem pouco compreendidos. Nossos resultados mostraram que o tratamento com LC pode reduzir os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β em ratos obesos diabéticos. Foi observado que essas citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão e secreção de mRNA da quemerina pelos adipócitos 3T3-L1.³³ O nível sérico de quemerina também está associado ao nível sérico de TNF- α em pacientes obesos.³⁴ Com base nesses achados, a redução da expressão de quemerina em camundongos diabéticos pode ser devido a uma diminuição na secreção de mediadores inflamatórios. A melhora da hiperinsulinemia também pode ser outro mecanismo da LC na redução da expressão da quemerina. Nossos resultados mostraram que a LC pode atenuar o aumento do nível de insulina em camundongos obesos e diabéticos. Como a insulina pode aumentar a secreção de quemerina do tecido adiposo *in vitro* e em explantes de tecido,³⁵ sugerimos que a redução da insulina em animais tratados com LC pode ter um papel regulador na expressão da quemerina nos tecidos adiposo e cardíaco de camundongos diabéticos.

Esse estudo tem algumas limitações. Em nosso estudo, a expressão gênica foi medida no tecido cardíaco total em animais experimentais. Tendo em vista que vários tipos de células cardíacas, como cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos, podem ter diferentes ações na patogênese da doença cardíaca, nossos dados não permitiram distinguir perfis de expressão entre os vários tipos de células. Além disso, foram confirmadas diferenças nos perfis de expressão gênica entre os tecidos cardíacos dos ventrículos direito e esquerdo e nos átrios, além das diferenças entre os tipos de células cardíacas. Assim, não diferenciamos a expressão gênica entre diferentes partes do tecido cardíaco nos animais experimentais. Outra limitação está relacionada ao fato de que medimos todos os fatores em animais adultos jovens e em um modelo experimental de diabetes de curto prazo. A este respeito, é interessante notar que o envelhecimento e o diabetes de longa duração são, de longe, o fator de risco dominante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e a prevalência de doenças cardiovasculares aumenta dramaticamente com o aumento da idade. Não determinamos se o tratamento com LC em ratos idosos ou diabetes de longa duração leva a uma downregulação semelhante à expressão de quemerina e seu receptor no tecido cardíaco de ratos diabéticos.

Conclusão

Em resumo, nossos dados mostraram que o consumo de uma dieta hipercalórica resultou em obesidade, resistência à insulina e upregulação da quemerina e seu receptor, CMKLR1, nos tecidos adiposo e cardíaco de camundongos. O tratamento de camundongos diabéticos com LC pode atenuar os sintomas de resistência à insulina e suprimir a superexpressão de quemerina em animais diabéticos. Os resultados do presente experimento ajudam a compreender o novo efeito regulatório da LC na expressão do gene cardíaco em condições de obesidade e diabetes. Mais estudos são necessários para fornecer mais evidências sobre a terapia nutricional com LC para o manejo não farmacológico de pacientes com diabetes e DCV com base na regulação dos componentes da quemerina no músculo cardíaco.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Tabandeh MR, Hosseini SA; Obtenção de dados: Amiri R; Análise

e interpretação dos dados: Amiri R, Tabandeh MR, Hosseini SA; Análise estatística: Amiri R, Tabandeh MR, Hosseini SA; Obtenção de financiamento e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Tabandeh MR; Redação do manuscrito: Amiri R, Tabandeh MR.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Shahid Chamran University of Ahvaz.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Rezvan Amiri pela Shahid Chamran University of Ahvaz.

Referências

1. Francesquet M, Silva PTD, Schneiders LB, Silveira JFCD, Soares SS, Tornquist D, et al. Youth overweight/obesity and its relationship with cardiovascular disease and parental risk factors. *Arch Endocrinol Metab.* 2019;63(4):411-416. doi: 10.20945/2359-3997000000156.
2. Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol.* 2014;63(4):250-9. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.11.006.
3. Moussa K, Gurung P, Adams-Huet B, Devaraj S, Jialal I. Increased eosinophils in adipose tissue of metabolic syndrome. *J Diabetes Complications.* 2019;33(8):535-538. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2019.05.010.
4. Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, et al. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol.* 1997;109(1):91-5. doi: 10.1111/1523-1747.ep12276660.
5. El Husseny MW, Mamdouh M, Shaban S, Ibrahim Abushouk A, Zaki MM, Ahmed OM, et al. Adipokines: Potential Therapeutic Targets for Vascular Dysfunction in Type II Diabetes Mellitus and Obesity. *J Diabetes Res.* 2017;2017:8095926. doi: 10.1155/2017/8095926.
6. El-Deeb TS, Bakkar SM, Eltoony L, Zakhary MM, Kamel AA, Nafee AM, et al. The adipokine chemerin and fetuin-a serum levels in type 2 diabetes mellitus: relation to obesity and inflammatory markers. *Egypt J Immunol.* 2018;25(1):191-202.
7. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Filarsky M, Bauer S, Wiest R, et al. Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes. *Clin Endocrinol.* 2010;72(3):342-8. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03664.x.
8. Kostopoulos CG, Spiroglou SG, Varakis JN, Apostolakis E, Papadaki HH. Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periaortic fat: a possible role for local chemerin in atherosclerosis? *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:56. doi: 10.1186/1471-2261-14-56.
9. Dimitriadis GK, Kaur J, Adya R, Miras AD, Mattu HS, Hattersley JG, et al. Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion. *Oncotarget.* 2018;9(24):16678-16690. doi: 10.18632/oncotarget.24659.
10. Rodríguez-Penas D, Feijóo-Bandín S, García-Rúa V, Mosquera-Leal A, Durán D, Varela A, et al. The adipokine chemerin induces apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(1):176-92. doi: 10.1159/000430343.
11. Hao J, Shen W, Tian C, Liu Z, Ren J, Luo C, et al. Mitochondrial nutrients improve immune dysfunction in the type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Cell Mol Med.* 2009;13(4):701-11. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00342.x.
12. Malone JJ, Schocken DD, Morrison AD, Gilbert-Barnes E. Diabetic cardiomyopathy and carnitine deficiency. *J Diabetes Complications.* 1999;13(2):86-90. doi: 10.1016/s1056-8727(99)00039-2.
13. Bavari M, Tabandeh MR, Varzi HN, Bahramzadeh S. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of L-carnitine against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug Chem Toxicol.* 2016;39(2):157-66. doi: 10.3109/01480545.2015.1063062.
14. Guimarães SMS, Cruz WMS, Weigert GS, Scalco FB, Colafranceschi AS, Ribeiro MG, et al. Decompensated Chronic Heart Failure Reduces Plasma L-carnitine. *Arch Med Res.* 2018;49(4):278-281. doi: 10.1016/j.arcmed.2018.09.004.
15. Vacante F, Senesi P, Montesano A, Frigerio A, Luzi L, Terruzzi I. L-Carnitine: An Antioxidant Remedy for the Survival of Cardiomyocytes under Hyperglycemic Condition. *J Diabetes Res.* 2018;9;2018:4028297. doi: 10.1155/2018/4028297.
16. Kohan Nr, Nazifi S, Tabandeh MR, Lari MA. Effect of L-Carnitine supplementation on apelin and apelin receptor (Apj) expression in cardiac muscle of obese diabetic rats. *Cell J.* 2018;20(3):427-434. doi: 10.22074/cellj.2018.5408.
17. Hamza RT, Elkabbany ZA, Shedid AM, Hamed AI, Ebrahim AO. Serum chemerin in obese children and adolescents before and after L-Carnitine therapy: relation to nonalcoholic fatty liver disease and other features of metabolic syndrome. *Arch Med Res.* 2016;47(7):541-549. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.11.010.
18. Gilbert ER, Fu Z, Liu D. Development of a nongenetic mouse model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:416254. doi: 10.1155/2011/416254.
19. Barrière DA, Noll C, Roussy G, Lizotte F, Kessai A, Kirby K, et al. Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. *Sci Rep.* 2018;8(1):424. doi: 10.1038/s41598-017-18896-5.
20. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(2):138-42. doi: 10.1590/2359-3997000000169.

21. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
22. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(8):3085-8. doi: 10.1210/jc.2008-1833.8.
23. Ernst MC, Issa M, Goralski KB, Sinal CJ. Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2010;151(5):1998-2007. doi: 10.1210/en.2009-1098.
24. Abate N. Obesity and cardiovascular disease. Pathogenetic role of the metabolic syndrome and therapeutic implications. *J Diabetes Complications*. 2000;14(3):154-74. doi: 10.1016/s1056-8727(00)00067-2.
25. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, et al. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 2007;109(9):3625-32. doi: 10.1182/blood-2006-08-038844.
26. Bene J, Hadzsiev K, Melegh B. Role of carnitine and its derivatives in the development and management of type 2 diabetes. *Nutr Diabetes*. 2018;7(8):8. doi: 10.1038/s41387-018-0017-1.
27. Aroor AR, Mandavia CH, Sowers JR. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. *Heart Fail Clin*. 2012;8(4):609-17. doi: 10.1016/j.hfc.2012.06.005.
28. Iwata D, Kato Y, Wakayama T, Sai Y, Kubo Y, Iseki S, et al. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN2 (SLC22A5) in distribution of its substrate carnitine to the heart. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(3):207-15. doi: 10.2133/dmpk.23.207.
29. Gao X, Mi S, Zhang F, Gong F, Lai Y, Gao F, et al. Association of chemerin mRNA expression in human epicardial adipose tissue with coronary atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:87. doi: 10.1186/1475-2840-10-87.
30. Hah YJ, Kim NK, Kim MK, Kim HS, Hur SH, Yoon HJ, et al. Relationship between chemerin levels and cardiometabolic parameters and degree of coronary stenosis in Korean patients with coronary artery disease. *Diabetes Metab J*. 2011;35(3):248-54. doi: 10.4093/dmj.2011.35.3.248.
31. Kutlay Ö, Kaygısız Z, Kaygısız B. The Effect of chemerin on cardiac parameters and gene expressions in isolated perfused rat heart. *Balkan Med J*. 2019;1;36(1):43-8. doi: 10.4274/balkanmedj.2017.1787.
32. Li HX, Chen KL, Wang HY, Tang CB, Xu XL, Zhou GH. Chemerin inhibition of myogenesis and induction of adipogenesis in C2C12 myoblasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;414:216-23. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.006.
33. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, et al. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul Pept*. 2009;154(1-3):102-6. doi: 10.1016/j.regpep.2009.02.010.
34. Parlee SD, Ernst MC, Muruganandan S, Sinal CJ, Goralski KB. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . *Endocrinology*. 2010;151(6):2590-602. doi: 10.1210/en.2009-0794.
35. Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, et al. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes*. 2009;58(9):1971-7. doi: 10.2337/db08-1528.

