



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUÍS FELIPE NOGUEIRA PAES BARRETO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DA CHEMERINA EM TECIDO
PLACENTÁRIO DE VACAS COM HIPERCETONEMIA**

RECIFE

2024

LUÍS FELIPE NOGUEIRA PAES BARRETO DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DA QUEMERINA EM TECIDO
PLACENTÁRIO DE VACAS COM HIPERCETONEMIA**

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

RECIFE

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Bibliotecário(a): Suely Manzi – CRB-4 809

O48a Oliveira, Luís Felipe Nogueira Paes Barreto de.

Análise da expressão do gene da quemerina em placenta de vacas com hipercetonemia / Luís Felipe Nogueira Paes Barreto de Oliveira. – Recife, 2024.

35 f.; il.

Orientador(a): Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –

3. Síndrome metabólica. 4. Metabolismo energético

5. Proteínas. I. Souza, Paulo Roberto Eleutério de, orient. II. Título

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DA QUEMERINA EM TECIDO
PLACENTÁRIO DE VACAS COM HIPERCETONEMIA**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

DATA DA APRESENTAÇÃO: 04 de outubro de 2024

Resultado: **APROVADO**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Membro Presidente - Orientador (UFRPE)

Profa. Dr Pabyton Gonçalves Cadena
Membro Titular (UFRPE)

Profa. Dra Renata Duarte da Silva Cezar
Membro Titular (UFPE)

Profa. Dra Nara Suzy de Aguiar Freitas
Suplente (UFRPE)

**RECIFE-PE
2024**

Dedicatória

Esses anos que passei na universidade foram de muita dedicação, de muitos estresses e felicidades. Eu queria dedicar esse trabalho em memória dos meus avôs Leonardo Davino de Oliveira e Plínio Nogueira que me criaram como filho e considero meus pais. A minha avó, Marlene Paes Barreto de Oliveira que me apoiou muito em tudo na minha vida e é minha segunda mãe. Aos meus tios Leonardo Davino e Leonildo Paes Barreto que sempre me apoiaram demais nos estudos e me incentivam cada vez mais em tudo que faço. Aos meus pais Luciana de Barros Nogueira e Leonilson Paes Barreto de Oliveira que se sacrificaram para me dar o melhor que eles podiam. Muito obrigado por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Após finalizar esse trabalho eu queria agradecer profundamente a todas as pessoas ao meu redor que me encorajaram a continuar estudando, e a nunca desistir desse caminho, mesmo sendo difícil. Primeiramente queria agradecer aos meus pais por sempre estarem juntos comigo em todos os momentos e me apoiarem sempre, aos meus tios que nunca duvidaram da minha capacidade e me apoiaram em todas as minhas escolhas, a minha avó que está comigo sempre me apoiando e me ajudando em tudo que se pode imaginar.

A minha família como um todo, muito obrigado a cada um por me incentivar a continuar nessa caminhada.

Quero agradecer minha namorada, Felícia maravilhosa, por me ajudar sempre, por me apoiar em tudo, por estar comigo em todos os momentos maravilhosos nessa ruralinda e fora dela, você deixou meus dias mais tranquilos e felizes na rural, muito obrigado.

Aos meus amigos queria agradecer por estarem passando por esses momentos difíceis comigo na universidade, vocês sabem o quão é complicado e sabem o quão gratificante é poder estudar na rural, sem vocês essa caminhada seria muito complicado, Carlos, Danilo, Leão, Adamo, Vitória, Mila, Lucas, David, Gabriel, Higgor entre muitos outros que não consigo citar agora pra não ficar gigantesca nessa lista. Obrigado a todos vocês estarem na minha vida.

Não posso esquecer-me dos meus companheiros de genoma Eduardo e Marcelo que me ajudaram demais nesse laboratório, agradeço muito por vocês estarem lá comigo.

Por fim, mas não menos importante, queria agradecer ao professor Paulo meu orientador, sem o senhor isso não seria possível, o senhor me ajudou demais, e eu não tenho como agradecer tudo o que o senhor fez por mim, às broncas, os ensinamentos, as risadas, professor eu não imagino outro professor que poderia me orientar que não seja o senhor, muito obrigado por me aceitar como seu orientando, o senhor é uma pessoa diferenciada dos demais, um professor nota 1000, muito obrigado por tudo professor Paulo.

Queria agradecer à Universidade Federal rural de Pernambuco por ser a melhor universidade de todas.

“A vida me ensinou a nunca desistir, nem ganhar nem perder, mas procurar evoluir. Podem me tirar tudo que tenho só não podem me tirar às coisas boas que eu já fiz pra quem eu amo. Eu sou feliz e canto. O universo é uma canção. Eu vou que vou. Histórias, nossas histórias, dias de luta, dias de glória”.

Charlie Brown JR

RESUMO

No período de transição em vacas leiteiras, entre o final da gestação e início da lactação ocorre um aumento da demanda energética, uma maior predisposição a mobilização da gordura corpórea e redução da capacidade digestiva do animal, predispondo-o a diversos distúrbios metabólicos, como a cetose. A quemerina é uma proteína produzida pelo tecido adiposo e está envolvida na adipogênese e nas respostas inflamatórias. O nível circulante de quemerina foi associado ao desenvolvimento de síndrome metabólica em humanos. O presente estudo teve como objetivo analisar a expressão de quemerina em placenta de vacas com e sem hipercetonemia. Foram analisadas a expressão do RNAm em placenta de 26 vacas prenhas, sendo 14 controle e 12 com hipercetonemia oriundas da clínica de bovinos de Garanhuns-PE pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados obtidos mostraram que há uma maior expressão da quemerina em vacas com hipercetonemia comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, houve relação significativa da expressão da quemerina com a quantidade de ácidos graxos não esterificados ($p < 0,05$). Assim, é possível concluir que a quemerina desempenha um papel significativo na cetose e está ligada ao acúmulo de ácidos graxos não esterificados na placenta de vacas, sugerindo que a quemerina pode ser utilizada como um provável biomarcador para a doença.

Palavras-chave: Quemerinas, Cetose, Síndrome Metabólica, Balanço energético negativo.

ABSTRACT

In the transition period in dairy cows, between the end of pregnancy and the beginning of lactation, there is an increase in energy demand, a greater predisposition to the mobilization of body fat and a reduction in the animal's digestive capacity, predisposing it to various metabolic disorders, such as ketosis. Chemerin is a protein produced by adipose tissue and is involved in adipogenesis and inflammatory responses. Circulating levels of chemerin have been associated with the development of metabolic syndrome in humans. The present study aimed to analyze the expression of chemerin in the placenta of cows with and without hyperketonemia. The expression of mRNA in the placenta of 26 pregnant cows, 14 control and 12 with hyperketonemia, from the Garanhuns-PE cattle clinic was analyzed using the real-time PCR technique. The results obtained showed that there is a greater expression of chemerin in cows with hyperketonemia compared to the control group ($p < 0.05$). Furthermore, there was a significant relationship between chemerin expression and the amount of non-esterified fatty acids ($p < 0.05$). Thus, it is possible to conclude that chemerin plays a significant role in ketosis and is linked to the accumulation of non-esterified fatty acids in the placenta of cows, suggesting that chemerin can be used as a likely biomarker for the disease.

Keywords: Chemerins, Ketosis, Metabolic Syndrome, Negative energy balance.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Estatística descritiva dos resultados da Avaliação da expressão do gene da quemerina em vacas com e sem hipercetonemia 25
- Tabela 2: Avaliação da homogeneidade da variância entre os grupos com e sem Hipercetonemia 25
- Tabela 3: Teste T pa student, para comparação de expressão do gene da quemerina em animais com e sem Hipercetonemia. 26
- Tabela 4: Correlação entre a concentração placentária do mRNA da quemerina com as concentrações sanguíneas de ácidos glaxos não esterificados (AGNEs), insulina e glicose em vacas com e sem Hipercetonemia. 27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

BNE - Balanço Energético Negativo

BMI - índice de massa muscular

Colesterol HDL - Lipoproteína de Alta Densidade

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

IL6 - interleucina 6

BHB - Beta Hidroxibutirato

NCBI - National Center for Biotechnology Information

AGNEs - Ácidos Graxos Não Esterificados

cDNA - DNA complementar

DEPC - dietilpirocarbonato

RNA - Ácido Ribonucleico

mRNA - RNA mensagem

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNase - Enzimas que quebram o DNA

PCR em tempo real - Reação de Cadeia de Polimerase em tempo real

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão da quemerina em tecido placentário de vacas com e sem hipercetonemia. Fonte: O autor

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Bovinocultura na Região Nordeste Brasileira	14
2.2 Cetose	15
2.3 Etiologia	15
2.4 Epidemiologia	16
2.5 Diagnóstico	16
2.6 Patologia	17
2.7 Tratamento	18
2.8 Marcadores inflamatórios	18
2.9 Quemerina	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 População de estudo	23
4.2 Extração de RNA	23
4.3 Análise da Expressão Gênica	23
4.4 Análise Estatística	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO	29
REFERENCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A expansão dos mercados, interno e externo, na comercialização de bovinos gerou transformações nas últimas décadas, tanto nos animais quanto em seus produtos derivados. Em decorrência disso, o manejo nutricional mudou com o intuito de evitar problemas futuros devido à intensificação dos sistemas de produção, mesmo assim não foi possível evitar o surgimento de enfermidades metabólicas, tornando comuns doenças como a cetose (SANTOS, 2011; XIMENES, 2014).

A cetose é uma doença metabólica que acomete principalmente vacas no período pré ou pós-parto (2 a 6 semanas após o parto), período em que o animal eleva sua demanda energética, principalmente devido ao aumento da produção de leite. Entretanto, o animal não acompanha tal exigência, culminando num balanço energético negativo (BNE), causando queda nos níveis de glicose e formação de corpos cetônicos (AVANZA, 2009; LINZMEIER, 2009; SANTOS, 2011). Na bovinocultura, cetose leva a alterações no bem estar dos animais e perdas significativas do rebanho leiteiro e a prejuízos econômicos (SANCHES *et al.*, 2000).

A quemerina (RARRES2 ou TIG2) é uma citocina produzida pelo tecido adiposo, envolvida na adipogênese e na resposta inflamatória, que é altamente expressa em adipócitos (COPPACK, 2001; WISSE, 2004). A concentração da quemerina tem sido associada com a síndrome metabólica (incluindo: índice de massa muscular (BMI), nível sérico de insulina em jejum, triglicerídeos e colesterol HDL), em humanos e ratos (BOZAOGLU *et al.*, 2007.; HU & FENG., 2011). Além disso, a quemerina tem sido associada com a resistência à insulina e intolerância à glicose no fígado e músculo esquelético. A quemerina também funciona como um fator quimiotático e mostra concentração aumentada em situações inflamatórias. TNF α , IL6, e proteína C reativa foram relacionadas com a concentração sanguínea da quemerina (SCHEIN, 2012).

Apesar de a literatura relatar certa relação entre quemerina e a síndrome metabólica em humanos, existem poucos estudos que mostram a relação de sua expressão em bovinos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do gene da quemerina na placenta de vacas com e sem cetose, para verificar se o mesmo pode atuar como um biomarcador da doença e se está associado ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos como a cetose.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bovinoculturas na Região Nordeste Brasileira

A cultura da criação bovina no nordeste brasileiro tem uma atuação importante economicamente, gerando renda para pequenos produtores, sendo passada de geração em geração além do contexto social. Inicialmente era utilizada apenas a carne do animal para o consumo, e com o passar do tempo foram sendo aproveitado mais daquilo que os ruminantes poderiam fornecer, fazendo com que além do leite bovino os derivados do leite fossem também consumidos. Outra grande importância é o consumo da carne e a exportação desta para outros países, fazendo com que não apenas o Nordeste, mas o Brasil como um todo pudesse vislumbrar o poder econômico do animal (XIMENES, 2014).

O leite bovino é um alimento barato de fácil acesso pela população, apresenta características nutricionais, como a presença de proteínas, micronutrientes, vitaminas e minerais, essenciais para o desenvolvimento humano. O ser humano, em geral, consome leite desde o nascimento, através da ingestão de leite materno, e com o desmame, o leite bovino atua como substituto, com isso os estudos para criação vêm crescendo, permitindo que os animais tenham uma melhor qualidade de vida, o que impacta diretamente na qualidade do leite produzido pelo animal (MANSUR, BURREGO, 2023).

Segundo (GUILHOTO., 2014), a bovinocultura no Nordeste do Brasil tem um grande impacto na economia, sendo muito bem desenvolvida na seção de cortes e produtos a base do couro dos ruminantes. Contudo, os animais de produção leiteira podem sofrer de algumas doenças que prejudicam a economia, tais como a cetose, que influencia a quantidade de leite produzido pelo animal, pois o animal doente não produz o leite, vem a óbito ou perde sua prole, fazendo com que o investimento feito seja perdido (MANSUR, BURREGO., 2023; SILVA *et al.*, 2020).

Segundo (SIQUEIRA., 2023) a quantidade do rebanho bovino cresceu chegando a 238,6 bilhões de cabeças atingindo um valor histórico e assim aumentando também a produção do leite em 2,4% chegando a 35,4 bilhões de litros de leite no ano de 2023.

2.2 Cetose

A cetose é uma doença metabólica que ocorre principalmente após o parto das vacas leiteiras, originada pela disfunção dos metabolismos de carboidratos e lipídios, decorrentes do balanço energético negativo em consequência do aumento da exigência de glicose para o crescimento fetal. A letalidade desta doença é alta caso não tratada, e acomete principalmente os ruminantes que não conseguem reverter o balanço negativo gerado pelo feto onde a mesma não consegue ingerir matéria seca para repor suas fontes de energia. A doença está ligada durante o período do parto desses animais quando elas iniciam a produção do seu leite, utilizando previamente a glicose como fonte primária na produção de energia, o animal se mantém dessa forma até esgotar o estoque de glicose em seu corpo, assim utilizando os lipídios em seu organismo gerando ácidos graxos e esses ácidos graxos gerados se acumulam em seu corpo prejudicando as funções hepáticas levando ao quadro de cetose bovina (AROEIRA.,1998; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

A presença de corpos cetônicos elevados no período de lactação é normal devido a maior demanda energética, contudo quando isso está ligado à baixa reprodutividade, queda na produção de leite e nível de beta hidroxibutirato (BHB) sanguíneo entre 1,2 e 2,9 mmol/L, indica cetose clínica (RUTHERFORD, 2016). Na cetose subclínica, o animal não apresenta os quadros visíveis de cetose, e é diagnosticado apenas quando são feitos testes bioquímicos no sangue ou no leite do animal, onde é detectado a presença de corpos cetônicos (CAMPO *et al.*,2005; RUTHERFORD *et al.*,2016).

2.3 Etiologia

Acontece comumente com os ruminantes, pois estão mais predispostos à cetose. No caso dos bovinos ocorre nos períodos de duas semanas antes do parto ou quando se inicia a lactação, pois os animais absorvem pouco carboidrato, e estes são degradados e transformados em glicose que é a sua principal fonte de energia. Neste período as fêmeas entram em balanço energético negativo, uma vez que durante a lactação os animais gastam mais da reserva de energia do seu corpo, sem reposição suficiente durante a alimentação, e assim surge a cetose, mesmo estando disponibilizado para o animal uma alimentação rica em nutrientes (DUFFIELD, 2009).

2.4 Epidemiologia

A prevalência da cetose varia nas diversas regiões geográficas. Na América do Sul, em 2010, foi encontrada uma prevalência de 14,8% no Chile, 12,1 % na Costa Rica e 10,3% na Argentina. Na América do Norte, Ontário - Canadá, de 1979 a 1981, a ocorrência foi de 12,1% nos primeiros 65 dias. Estudos mais recentes mostraram uma incidência cumulativa de 61% em 2.600 vacas e 45,1% em 1.010 vacas nas primeiras nove semanas. Outros estudos com 1.333 vacas holandesas registraram uma prevalência de 14,1% (BERGMANN, 2022). Em relação ao Oriente Médio, num estudo realizado no Irã com 16 rebanhos, registrou com a condição 63% na 2ª semana, 68% na 4ª semana, e 59% na 6ª semana pós-parto, sendo 97% diagnosticadas em pelo menos uma semana e 30% em todas as semanas, especialmente entre a segunda e a terceira. Na Turquia, em cinco rebanhos, 33,33% de 78 vacas apresentaram cetose subclínica, com a maior incidência nas três primeiras semanas do puerpério. Um estudo anterior na mesma região, nos primeiros 15 dias já apresentou prevalência de 11,2% o que pode indicar a possibilidade de aumento dos casos nas próximas semanas (SUTHAR *et al.*, 2013).

Os quadros de cetose apresentados no Brasil têm uma taxa de ocorrência de 0,2% até 10% em um rebanho no período de lactação. Dentre os tipos de cetoses observados, o que mais chama atenção é os dados da cetose subclínica onde sua ocorrência é de 10 a 30%, enquanto os de cetose clínica é de 3% a 7%. Os animais nos períodos entre a segunda e a sétima semana de lactação são os que mais apresentam a cetose, sendo mais incomum na primeira gestação. No Brasil verifica-se uma maior incidência da doença no verão com 22% comparado ao inverno com 19,5%. Além disso, o manejo dos animais pode influenciar positivamente na diminuição das taxas de cetose em um rebanho, visto que animais que tem uma alimentação mais rica tendem a não apresentar a cetose, ou apresentar de forma mais branda (AUDOR, ESPINOSA., 2018; BERGMANN., 2022; SCHEIN, 2012).

2.5 Diagnóstico

Em um estágio mais inicial da doença, o animal apresenta comportamentos de solidão, apatia, e em seguida com a piora do seu quadro o mesmo começa a apresentar sintomas de cegueira, muita salivação, tremores em sua musculatura, e progride para uma fraqueza muscular (BATISTA *et al.*, 2016). Com a observação de alterações súbitas na produção de leite, perda de peso e recusa a ingestão de concentrados adequados, é feito o

diagnóstico através de exames laboratoriais ou pelo uso de fitas que irão reagir, caso o animal seja positivo a presença de corpos cetônicos na urina (CAMPO *et al.*, 2005)

Um meio confiável fundamental para o diagnóstico precoce desse distúrbio seria a observação da concentração de B-hidroxibutirato (BHB), um corpo cetônico, que pode ser encontrado em um exame de hemograma ou de urina. O teste é realizado no pós-parto onde esse agente, entre outros, está ligado à mobilização de gordura no corpo. Também pode ser observada a concentração dos minerais e eletrólitos (CAMPO *et al.*, 2005; SCHEIN., 2012). Análise de glicose, cetona e ácidos graxos no sangue, leite, e urina pode levar ao diagnóstico. Testes como Rothera, e outros que são realizados em humanos para monitorar a diabetes, são utilizados para identificar a presença de cetona e de ácido acético na amostra (CAMPO *et al.*, 2005; SCHEIN., 2012).

No diagnóstico clínico é possível que nos casos que estejam mais avançados, o médico veterinário e os tutores do animal notem um odor de corpos cetônicos na pele, leite, urina e hálito. No geral, o animal que possui essa patologia não necessariamente irá morrer, se for tratado sua recuperação é espontânea. Do contrário a falta de tratamento pode levá-lo a óbito por este não ter forças para se locomover e se alimentar sozinho, gerando assim uma diminuição da produção do leite (BATISTA *et al.*, 2016).

2.6 Patologia

A cetose se inicia em um período próximo ao parto ou após o mesmo, quando se tem os estímulos para a produção do leite e o animal necessita de uma grande quantidade de alimento rico em nutrientes. Dessa forma animal acaba entrando em um déficit de energia corporal, onde a quantidade de alimentos consumidos que foram transformados em energia é menor do que o gasto energético (ROSA *et al.*, 2022; RUTHERFORD *et al.*, 2016).

A cetose subclínica é uma patologia que acomete o rebanho leiteiro, ela se instala quando se tem um aumento de corpos cetônicos (ácido acetoacético, acetona e ácido β -hidroxibutírico) no sangue, urina e no leite do rebanho. Isso acontece devido à necessidade do corpo do animal de ter mais energia para produzir leite, mas não está recebendo o suficiente devido aos baixos níveis de glicose no sangue e altos níveis de corpos cetônicos, assim se instalando a cetose subclínica nos ruminantes (DUFFIELD, 2009; ROSA *et al.*, 2022)

Dentro de um rebanho de produção leiteira pode-se encontrar alguns indivíduos que apresentem o quadro de Cetose, esses indivíduos acometidos tendem a diminuir sua produção de leite por conta da doença, fazendo com que o leite contenha cada vez mais gordura, e cada vez menos concentração de proteína, fazendo o leite perde gradativamente nutrientes para consumo e para a utilização do mesmo na fabricação de produtos derivados. (DUFFIELD, 2009)

Dessa forma, constata-se que os pequenos e grandes produtores de leite e derivados sofrem uma grande perda em sua fabricação, fazendo com que não apenas eles como os revendedores tenham uma queda em seu faturamento, devido à má qualidade do leite pela contaminação com cetona e estando mais gorduroso (DUFFIELD, 2009)

2.7 Tratamento

O tratamento feito com hepatoprotetor homeopático ministrados nos animais até 15 dias após o parto se mostrou positivo, e este pode ser utilizado de forma diária tendo uma maior eficácia. Esse período deve-se à, uma vez que, estudos prévios comprovam que a taxa de BHB estaria em seu pico nas duas primeiras semanas em que a doença se manifesta. Assim minimiza-se os danos de grandes produtores, com tratamentos preventivos e tratamentos intensivos quando a doença está localizada (MINUZZI *et al.*, 2013).

Os princípios fundamentais para tratar são baseados em restabelecer níveis de glicose no sangue rapidamente, restabelecer os níveis de oxalacetato que leva a redução de produção de corpos cetônicos e aumento de gliconeogênese, e aumentar os ácidos propiônicos. Inicialmente, deve-se fazer uma administração lenta e contínua de 20L de glicose 5%, durante 24h, monitorando através da urina e do sangue 1 a 2 vezes por dia, continuando o tratamento até não haver corpos cetônicos na urina, e então repetir administração de dextrose de 12 em 12 horas e podem-se somar precursores da glicose oralmente como fonte de energia, como propionato, glicerol e propilenoglicol realizando no mínimo os 3 tratamentos simultaneamente no animal. (SCHEIN, 2012).

2.8 Marcadores inflamatórios

Os processos causados pela síndrome metabólica como, problemas cardíacos, no fígado, fadiga muscular, podem ser notados devido a presença de marcadores reagentes a processos inflamatórios, que podem ser um alvo para possíveis formas de terapias para a

melhora do indivíduo. Foram notadas algumas proteínas que atuam no processo inflamatório associado à síndrome metabólica, onde algumas como TNF α , Interleucina-6, leptina, adiponectina e resistina, atuam de formas diferentes em organismos saudáveis e organismos com problemas metabólicos. Cada uma dessas moléculas atua de uma forma nos processos inflamatórios como a quemerina, onde esses marcadores têm funções pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Nos casos dos marcadores pró-inflamatórios a sua maior presença no organismo indica sinais de desordem metabólica, devido a sua tendência de fazer com que o organismo armazene e estimule a produção de células adiposas, enquanto os marcadores anti-inflamatórios tendem a fazer com que ocorram os processos normais, fazendo assim o corpo continuar em homeostase (BRITO *et al.*, 2013 ; VOLP *et al.*, 2008).

2.9 Quemerina

A quemerina é uma proteína multifuncional ligada a alguma parte da fisiologia da pele, participava nos processos inflamatórios, possui um papel no metabolismo ósseo, adipogênico e na diferenciação de adipócitos, e atua como uma quimiocina devido a sua função quimioatrativa para leucócitos no organismo regulando processos imunológicos, além de muitas outras funções, tais como a regulação da glicemia. É encontrada em todo o corpo do animal não apenas no tecido adiposo, mas também no pâncreas, fígado, rim, pulmão e órgão reprodutores (YU *et al.*, 2022). Em pacientes obesos e com problemas cardíacos é visto a ação da quemerina em prol do processo inflamatório agindo da mesma forma, atraindo moléculas que vão auxiliar no processo inflamatório (BONDUE, 2011).

O nome quemerina deve-se ao fato dela se ligar a uma proteína do macrófago (chemR23). O gene quemerina em bovino está localizado no cromossomo 4 (sequência de referência do NCBI: NM_001046020.2) e consiste de seis exons, com os exons 2, 3, 4 e 5 codificando uma proteína com 162 aminoácidos (LINDHOLM-PERRY *et al.*, 2012). A quemerina é sintetizada de forma inativa como pró-quemerina e se torna ativa pelo processamento proteolítico de sua extremidade carboxi-terminal por enzimas serino proteases. A quemerina ativa liga-se ao receptor celular CMKLR1 e aumenta o cálcio intracelular. A quemerina ativa também é utilizada por outro tipo de receptor, chamado de CCRL2, através de sua extremidade N-terminal, que expõe sua extremidade C-terminal ao receptor CMKLR1 expresso em células próximas. O processamento proteolítico da quemerina pelas proteases da quemerina gera o peptídeo que é inibitório chamado chemerina-

15, que se liga ao receptor CMKLR1 e inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios em resposta ao interferon gama (PAIVA., 2018; FLORES-LE ROUX *et al.*, 2011)

A quemerina está relacionada à aterosclerose e pode atuar como preditor de risco na relação entre aumento de gordura visceral e aterogênica. São novos os estudos sobre a quemerina, contudo alguns apresentam que as concentrações dessa adipocina podem estar alteradas em diversas doenças onde a obesidade é uma delas na qual se acredita que a quemerina desempenha um papel importante na diferenciação dos adipócitos através da sinalização parácrina, que altera a função do tecido adiposo e também pode desempenhar um papel na angiogênese, que é considerada um processo essencial para a expansão do tecido adiposo (PAIVA., 2018; FONTES *et al.*.,2018)

Uma das principais funções da quemerina está associada a ações em prol da inflamação, visto que nos pacientes obesos e com problemas cardíacos, ela atua com outras moléculas auxiliando no processo inflamatório através da sua ação quimioatrativa fazendo com que haja atração de células do sistema imunológico para o local da inflamação (BONDUE, 2011).

A ação da quemerina na síndrome metabólica não está muito bem esclarecida, contudo, experimentos com camundongos mostraram que a regulação da quemerina está associada à quantidade de tecido adiposo no organismo. Como a concentração de quemerina está associada ao acúmulo de gordura abdominal, a síndrome metabólica tem seu agravamento devido ao acúmulo de gordura nos órgãos, aumentando de início a pressão arterial devido a atuação na vasoconstrição, com isso vai se agravando a situação do indivíduo auxiliando a aparição de doenças associada como lúpus, obesidade, e câncer de intestino em humanos (SU *et al.*, 2021).

Existem algumas hipóteses sobre a quemerina devido ela estar relacionada às doenças metabólicas, inflamatórias e cardiovasculares. Foi observado que a quemerina tem sua expressão em vários tecidos humanos e também na placenta. Sua expressão foi observada sendo maior no fígado, no tecido adiposo e gordura visceral, com isso foi notado que pessoas obesas e com índice de massa corpórea (HELPER, WU., 2018). A quemerina quando está relacionada a gravidez não se tem tantos estudos para elucidar as dúvidas mas devido a estudos observados é notado que a quemerina está possivelmente ligada a complicações gestacionais. (GUTAJ *et al.*,2020)

Quando se relaciona a quemerina com a diabetes gestacional, é observado que devido à quantidade maior de quemerinas circulantes no corpo, dificulta a ligação da insulina com a glicose, fazendo com que a gestante possa vir a desenvolver diabetes gestacional. (GUTAJ *et al.*,2020)

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a expressão do gene da quemerina na placenta de animais com e sem cetose atendidos na clínica de bovinos de Garanhuns-PE

3.2 Específicos

- Avaliar a expressão da quemerina em tecido placentário de bovinos com e sem Cetose;
- Comparar o nível de expressão da quemerina em animais com e sem Cetose;
- Verificar se existe associação entre o nível de quemerinas com a dosagem de glicose, insulina, e AGNEs na população de estudo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de Estudo

Foram utilizadas amostras de cDNA de vacas prenhas, oriundas de rebanhos do estado de Pernambuco e encaminhadas para atendimento clínico-obstétrico na Clínica de Bovinos de Garanhuns/UFRPE. Estas vacas foram submetidas ao exame clínico (CONSTABLE *et al.*, 2017), para estabelecer o diagnóstico de cetose ou outros problemas obstétricos. As vacas foram categorizadas em dois grupos: Grupo sem Cetose (G1) e o Grupo com Cetose (G2). Estimou-se, o número amostral de 12 animais com Cetose e 14 do grupo controle. Indicadores de inclusão para o G2 foram o quadro de Cetose, bem como dados das concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato $\geq 0,8$ mmol/L e de AGNE $\geq 0,4$ mmol/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). O grupo controle (G1) foi constituído por vacas que não apresentavam dados clínicos e laboratoriais característicos de Cetose, conforme indicadores supracitados.

Doze animais contendo cetose e quatorze animais foram abatidos segundo as normas do (RIISPOA, 1980). Imediatamente após o abate, foram coletadas amostras de tecido placentário. Para esse procedimento, foram utilizados bisturi, tesouras e pinças. O material usado para coleta foi esterilizado e, em seguida, tanto o material como os tecidos foram lavados com água DEPC (livre de Rnase), armazenados em criotubos de 2mL contendo 300 μ L de trizol e mantidos em -80°C até a extração de RNA.

4.2 Extração de RNA

Para extração do RNA total, foi utilizado o método trizol, conforme as instruções do fabricante (Trizol; Invitrogen Life Technologies). Posteriormente, o RNA total foi purificado com DNase I (PROMEGA), quantificado por espectrofotometria (Bionnate 3, THERMO SCIENTIFIC), e sua integridade avaliada utilizando-se SYBR Green II (LCG BIOTECNOLOGIA) em gel de agarose a 1%.

4.3 Análise da Expressão Gênica

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total, utilizando-se o *kit* IMPROM-II TRANSCRIPTASE (PROMEGA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas usando o Rotor-GENE Q (QUIAGEN), com um volume total de 20 μ L por reação, sendo 2 μ L de cDNA diluído (1 cDNA: 9 H₂O DEPC), 0,5 μ L de 10 μ M cada *primer*, 10 μ L de 2X QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QUIAGEN) e 7,0 μ L de água, com as seguintes

definições: 94°C, durante 15 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C, durante 30 segundos, temperatura anelamento específica dos *primers*, que foram desenhados com base na sequência disponível no *GenBan* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As reações foram realizadas em triplicatas juntamente com o controle negativo. A RNA polimerase II será utilizada como controle endógeno.

4.4 Análise Estatística

A quantificação relativa do $\Delta\Delta Ct$ foi realizada de acordo com Livak e Schmittgen (2001). A diferença entre a média do Ct do gene de interesse e a média de Ct do gene endógeno (ΔCt) foi calculada para normalização. A expressão relativa de cada gene foi calculada pela forma $2^{-\Delta Ct}$, e o resultado para a expressão do gene foi determinado por um valor adimensional por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O fator testado foi o grupo com hipercetonemia e sem hipercetonemia (Controle saudável). A comparação entre as médias foi analisada pelo teste t de Student. Os valores foram expressos como média \pm erro-padrão da média. Para verificar a homogeneidade das variâncias foi usado o teste de Levene.

5. RESULTADOS

A concentração de quemerina foi determinada numa população de 26 vacas no momento do parto, sendo 14 no grupo controle e 12 no grupo hiperctonemia . Houve uma maior expressão da quemerina grupo hiperctonemia comparado ao grupo controle (0.117 vs -2, 31, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1: Estatística descritiva dos resultados da Avaliação da expressão do gene da quemerina em vacas com e sem hiperctonemia

Descritivas de Grupo						
	Grupo	n	Média	Mediana	DP	Erro-padrão
Quemerina	Controle	14	-2.31	-3.03	2.72	0.727
	Hiperctonemia	12	0.117	-0.585	1.95	0.564

Número de indivíduos, DP= Desvio Padrão.

Para examinar se a variância entre os grupos foi homogênea ou não, realizamos o teste de Levine. Com o valor de $p > 0.05$, podendo afirmar que as variâncias foram homogêneas entre os grupos analisados (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da homogeneidade da variância entre os grupos com e sem Hiperctonemia

Teste à Homogeneidade de Variâncias (Levene)				
	F	gl	gl2	p
Quemerina	1.96	1	24	0.174

F= valor da estatística calculado pelo teste de Levene; **gl** = grau de liberdade; **gl2**= grau de liberdade dentro dos grupos; **P**= p-value.

A avaliação da diferença entre os grupos foi avaliada através do Teste de Student, sendo os grupos considerados significativamente diferentes $p < 0,05$ (Tabela 3), ou seja, o grupo com hiperctonemia teve uma maior expressão de quemerina comparado ao grupo controle.

Tabela 3: Comparação de expressão do gene da quemerina em animais com e sem Hiperetonemia.

Teste t para amostras independentes				
Quemerina	t de Student	Estatística	gl	p
		-2.57	24.0	0.008
G	U de Mann-Whitney	41.0		0.014

gl = grau de liberdade; P= p-value.

A Figura 1 mostra a maior expressão da quemerina em vacas com hiperetonemia comparada ao grupo controle.

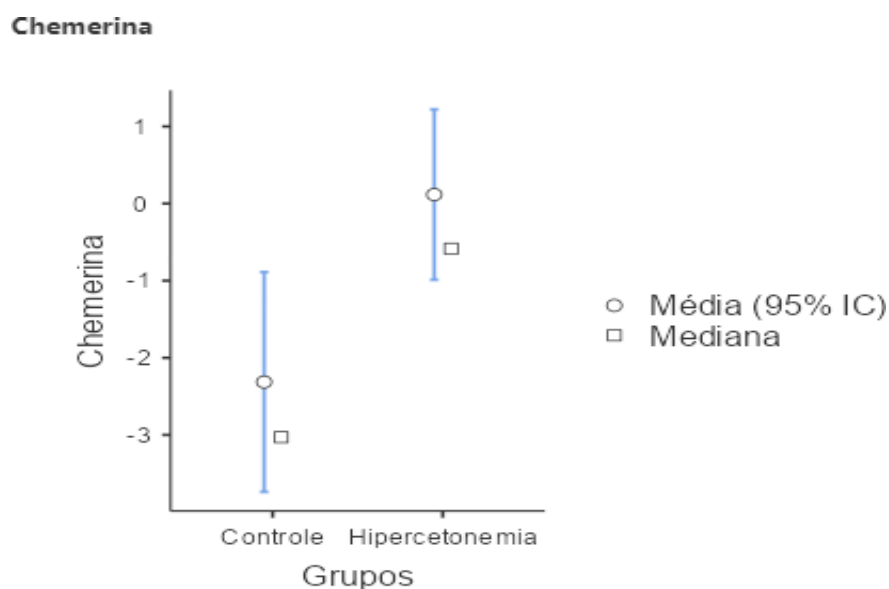


Figura 1: Expressão da quemerina em tecido placentário de vacas com e sem hiperetonemia. Fonte: O autor.

Ao avaliarmos a correlação da concentração placentária do mRNA da quemerina do grupo com hiperetonemia com as concentrações de ácidos graxos não esterificados AGNEs, insulina e glicose, verificamos que houve diferença significativa da expressão da quemerina com a quantidade de AGNEs (Tabela 4).

Tabela 4: Correlação entre a concentração placentária do mRNA da quemerina com as concentrações sanguíneas de ácidos graxos não esterificados AGNEs, insulina e glicose em vacas com e sem Hipercetonemia.

Matriz de Correlação		quemerina	AGNEs	insulina	glicose
Quemerina	R de Pearson	-	-	-	-
	gl	-	-	-	-
	p-value	-	-	-	-
AGNEs	R de Pearson	0,520	-	-	-
	gl	23	-	-	-
	p-value	0,008	-	-	-
insulina	R de Pearson	-0,377	-0,251	-	-
	gl	24	23	-	-
	p-value	0,058	0,226	-	-
glicose	R de Pearson	-0,207	-0,066	-0,059	-
	gl	24	23	24	-
	p-value	0,310	0,753	0,774	-

Nota.* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

6. DISCUSSÃO

A cetose é uma doença metabólica caracterizada pelo aumento de corpos cetônicos que aparece principalmente em vacas em lactação (de 2 a 6 semanas após o parto) associada ao alto gasto energético e consequente diminuição na produção de leite (SANTOS, 2011), isto se deve ao fato que nas últimas semanas que antecedem o parto em vacas, ocorre aumento da demanda energética, com maior predisposição à mobilização da gordura corpórea e a redução da capacidade ingestiva. Desta forma, os animais utilizam suas reservas de ácidos graxos corporais para repor sua demanda energética. Porém, existe um limite que os ácidos graxos podem ser manipulados pelo organismo e utilizados pelo fígado. Quando este limite é atingido, as gorduras não são mais queimadas para fornecer energia, e começa a se acumular nas células do fígado como triglicerídeos, e alguns dos ácidos graxos são convertidos em cetonas (GOFF., 2006; GUARD., 2000).

A quemerina foi descrita inicialmente como uma nova quimiocina ligante de receptor acoplado à proteína G, tais como CMKLR1, GPR1, and CCRL2 expressos em células dendríticas e macrófagos (BARNEA *et al.*, 2008; ZABEL, *et al.*, 2005; ZABEL *et al.*, 2008). Embora a contribuição relativa de tecidos ou células para os níveis sistêmicos da quemerina, não esteja completamente estabelecida, análises do padrão de expressão em camundongos revelaram que a mesma é altamente expressa em tecidos adiposos e no fígado (PARLEE *et al.*, 2010).

No presente estudo, nós avaliamos se existia uma relação entre a concentração da quemerina placentária com o distúrbio metabólico cetose. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão do RNAm da quemerina no grupo de animais com hipercetonemia. Estes dados suportam a hipótese que a que a expressão de mRNA da quemerina está associada ao fenótipo da síndrome metabólica, visto em humanos e outros animais (BOZAOGLU *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2013; ROH *et al.*, 2016). Este foi o primeiro estudo avaliando a expressão da quemerina em tecido placentário de vacas com e sem hipercetonemia.

Níveis séricos de BHB estão entre 0,0 a 1,1 mmol/dl considera-se que os animais estão saudáveis. Por outro lado, valores superiores a 1,2 mmol/dl têm sido relacionados com cetose (NOVAES *et al.*, 2019). No presente estudo, encontramos uma associação significativa entre o nível de AGNEs, e BHB. Estes dados podem ser justificados uma vez

que segundo (NOVAES *et al.*, 2019 & BERGMANN, 2022) os níveis de AGNEs aumentavam em torno de sete vezes, no animal no período de lactação, para a vaca conseguir gerar energia para o feto e para si. Além disso, os ácidos graxos são consumidos como uma fonte de energia nos tecidos periféricos e que com um balanço energético negativo decorrente do período gestacional em vacas esteja relacionado com maior consumo de AGNEs e maior síntese de quemerina.

7. CONCLUSÃO

É possível concluir que a quemerina desempenha um papel significativo na cetose e que também está ligada ao acúmulo de ácidos graxos não esterificados na placenta de vacas, sugerindo que a mesma pode ser utilizada como um possível biomarcador para cetose bovina. Estudos com este viés devem ser encorajados devido à importância econômica e de saúde nos animais, pois animais de produção de leite fazem parte de um grande poder econômico no país, e estudos sobre ela ajudariam a economia, pois os animais acometidos pela doença diminuem por um período sua produção de leite e continuam gerando os menos gastos para os produtores.

REFERÊNCIAS

AROEIRA, L. J. M. Cetose e infiltração gordurosa no fígado em vacas leiteiras. 1998.

AUDOR, Adriana Marcela Garzón; ESPINOSA, Olimpo Juan Oliver. Epidemiología de la cetosis en bovinos: una revisión. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 42-61, 2018.

BARNEA, G. et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 1, p. 64-69, 2008.

BATISTA, F. C. C. et al. Cetose bovina: Revisão da literatura. **Nucleus Animalium**, v. 8, n. 1, p. 3-3, 2016.

BERGMANN, Emely et al. Relação entre nutrição e ocorrência de cetose no parto de vacas leiteiras. In: **OPEN SCIENCE RESEARCH VI**. Editora Científica Digital. p. 350-362. 2022

BONDUE, B.; WITTAMER, V.; PARMENTIER, M.. Chemerin e seus receptores no tráfico de leucócitos, inflamação e metabolismo. **Revisões de citocinas e fatores de crescimento**, v. 5-6, pág. 331-338, 2011.

BOZAOGLU, K. et al. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4687-4694, 2007.

BRITO, L. F. et al. Produtos naturais ativadores de PPAR e marcadores associados ao processo inflamatório na Síndrome Metabólica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 449-466, 2013.

CAMPOS, R. et al. Determinação de corpos cetônicos na urina como ferramenta para o diagnóstico rápido de cetose subclínica bovina e relação com a composição do leite. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 49-54, 2005.

CONSTABLE, P. D.; et al. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 11th ed. Saunders, Edinbourg, 2017. 2278p.

COPPACK, S. W. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. **Proceedings of the nutrition society**, v. 60, n. 3, p. 349-356, 2001.

DENG, Y. et al. Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis. **Endocrinology**, v. 154, n. 5, p. 1794-1801, 2013.

DUFFIELD, T.F. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **J. Dairy Sci.**, v. 92, p. 571–580, 2009.

FLORES-LE ROUX, Juana A.; BOIX, David Benaiges; MONTOYA, Juan Pedro Botet. Quemerina: una nueva adipoquina. **Clínica e investigación en arteriosclerosis**, v. 23, n. 4, p. 175-182, 2011.

FONTES, Vanessa Sequeira; NEVES, Felipe Silva; CÂNDIDO, Ana Paula Carlos. Quemerina e fatores relacionados ao risco cardiovascular em crianças e adolescentes: uma revisão sistemática. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 36, n. 02, p. 221-229, 2018.

GOFF, J. P. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. **Animal feed science and technology**, v. 126, n. 3-4, p. 237-257, 2006.

GUARD, C. L. Fresh cow problems are costly: Culling hurts the most. **Hoard's Dairyman**, v.141, p.8,1996.

GUILHOTO, J et al. Contribuição Da Agricultura E Do Agronegócio Familiar Para O Pib Do Nordeste (The Importance of the Family Agribusiness to the Northeast Region GDP). **Revista Econômica do Nordeste**, v. 45, p. 136-152, 2014.

GUTAJ, Paweł et al. The role of the adipokines in the most common gestational complications. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9408, 2020.

HELPER, Gisela; WU, Qing-Feng. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. **Journal of Endocrinology**, v. 238, n. 2, p. R79-R94, 2018.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Academic Press, San Diego, 916p, 2008

LINDHOLM-PERRY, Amanda K. et al. **Evaluation of bovine chemerin (RARRES2) gene variation on beef cattle production traits**. *Frontiers in Genetics*, v. 3, p. 39, 2012.

LINZMEIER, L. G.; AVANZA, M. F. B. Toxemia da prenhez. **Rev Cient Eletrônica Med Vet**, v. 12, p. 1-6, 2009.

MANSUR, I. da C. ; BURREGO, L. da S. **Revisão bibliográfica do leite bovino: por que consumir o leite? O leite bovino é saudável?**, 2023. Trabalho de conclusão de curso (Curso Técnico em Alimentos) - Escola Técnica Estadual ETEC de Sapopemba (Fazenda da Juta - São Paulo), São Paulo, 2023.

MINUZZI, T. et al. Prevenção de cetose em bovinos de leite através do uso de homeopatia. **Unijuí: Desconhecida**, 2013.

NOVAES, L. P. et al. **Procedimentos para manejo correto de vaca gestante no pré-parto**. Embrapa Gado De Leite, Juiz De Fora, 2004.

PARLEE, S. D. et al. Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α . **Endocrinology**, v. 151, n. 6, p. 2590-2602, 2010.

PAIVA, Ana Paula Lopes. **Associação dos níveis de quemerina com fatores de risco cardiovascular em mulheres nas áreas distritais de Ouro Preto, Minas Gerais**. 2018.

ROSA, N. L. G. et al. Cetose clínica e subclínica em vacas de alta lactação Clinical and subclinical ketus in high-lactation cows. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 6, p. 46441-46445, 2022.

ROH, Sang-Gun et al. Physiological roles of adipokines, hepatokines and myokines in ruminants. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, vol. 29, no. 1, p. 1, 2016.

RUTHERFORD. et al .. Journal of Dairy Science, v. 99, n. 6, p. 4808-4815, June 2016.

SANCHES, A. W. D. et al. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 113-118, 2000.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios metabólicos. **Nutrição de ruminantes**, v. 2, p. 439-520, 2011.

SCHEIN, I. H. Cetose dos ruminantes. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no segundo semestre de 2012.

SILVA, F. G. et al. Adesão ao tratamento anti-hipertensivo e ocorrência de Síndrome Metabólica. **Escola Anna Nery**, v. 25, p. e20200213, 2020.

SIQUEIRA, B. **Valor da produção da pecuária e aquicultura chega a R\$ 122,4 bilhões em 2023**. IBGE, 2023. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/41352-valor-da-producao-da-pecuaria-e-aquicultura-chega-a-r-122-4-bilhoes-em-2023>

SU, Xin et al. Chemerin em doenças inflamatórias. **Clínica Química Acta** , v. 517, pág. 41-47, 2021.

SUTHAR, V. S. et al. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 5, p. 2925-2938, 2013.

VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 537-549, 2008.

WISSE, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. **Journal of the American society of nephrology**, v. 15, n. 11, p. 2792-2800, 2004.

XIMENES, L. F.. Bovinocultura leiteira no Nordeste: uso racional dos fatores de produção para maiores lucratividade e rentabilidade. 2014.

YU, M. et al. Chemerin: uma adipocina funcional na saúde e doenças reprodutivas. **Biomedicinas** , v. 10, n. 8, pág. 1910, 2022

ZABEL,et al. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 244-251, 2005.

ZABEL, B. A. et al. Mast cell–expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 10, p. 2207-2220, 2008.