

## Efeitos da Rosuvastatina sobre Apolipoproteína J em Artérias de Ratos Lesionadas com Balão

*Effects of Rosuvastatin on Apolipoprotein J in Balloon-Injured Carotid Artery in Rats*

Ning Yang, Bo Dong, Jinyu Yang, Yang Li, Lu Kou, Yue Liu, Qin Qin

Department of Cardiovascular, Tianjin Chest Hospital, Tianjin - China

### Resumo

**Fundamento:** A reestenose após intervenção coronária percutânea (ICP) na doença coronariana continua um problema não solucionado. Estudos relataram que os níveis de clusterina (CLU), também chamada de apolipoproteína (Apo) J, encontram-se elevados na progressão da reestenose pós-angioplastia e na aterosclerose. Contudo, seu papel na hiperplasia neointimal ainda é controverso.

**Objetivo:** Elucidar o papel da Apo J na hiperplasia neointimal na artéria carótida utilizando um modelo experimental com ratos *in vivo*, com e sem intervenção com rosuvastatina.

**Métodos:** ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em três grupos – grupo controle (n = 20), grupo modelo (n = 20), e grupo intervenção com estatina (n = 32). Os ratos no grupo intervenção receberam 10 mg/kg de rosuvastatina. Um cateter Fogarty 2 F foi introduzido para induzir lesão vascular. A formação de neointima foi analisada 1, 2, 3 e 4 semanas após lesão com balão. Concentrações de Apo J foram medidas por PCR em tempo real, imuno-histoquímica e *western blotting*.

**Resultados:** A razão área íntima/média (I/M) aumentou após a lesão com balão e atingiu o valor máximo 4 semanas pós-lesão no grupo modelo; observou-se um pequeno aumento na I/M na semana 2, que cessou após a administração de rosuvastatina. Os níveis de mRNA e proteína da Apo J nas artérias carótidas aumentaram significativamente após administração de rosuvastatina em comparação ao grupo modelo, atingindo o máximo na semana 2, mais cedo em comparação ao grupo modelo (semana 3).

**Conclusão:** A Apo J atuou como reagente de fase aguda após lesão com balão nas artérias carótidas de ratos. A rosuvastatina pode reduzir a formação de neointima por aumento de Apo J. Nossos resultados sugerem que a Apo J exerce um papel protetor na reestenose após lesão com balão em ratos. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(4):562-568)

**Palavras-chave:** Doença da Artéria Coronária; Intervenção Coronária Percutânea; Rosuvastatina Cálcica; Apolipoproteína J; Reestenose Coronária; Ratos.

### Abstract

**Background:** Restenosis after percutaneous coronary intervention in coronary heart disease remains an unsolved problem. Clusterin (CLU) (or Apolipoprotein [Apo] J) levels have been reported to be elevated during the progression of postangioplasty restenosis and atherosclerosis. However, its role in neointimal hyperplasia is still controversial.

**Objective:** To elucidate the role of Apo J in neointimal hyperplasia in a rat carotid artery model *in vivo* with or without rosuvastatin administration.

**Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into three groups: the control group (n = 20), the model group (n = 20) and the statin intervention group (n = 32). The rats in the intervention group were given 10mg/kg dose of rosuvastatin. A 2F Fogarty catheter was introduced to induce vascular injury. Neointima formation was analyzed 1, 2, 3 and 4 weeks after balloon injury. The level of Apo J was measured by real-time PCR, immunohistochemistry and western blotting.

**Results:** Intimal/medial area ratio (intimal/medial, I/M) was increased after balloon-injury and reached the maximum value at 4 weeks in the model group; I/M was slightly increased at 2 weeks and stopped increasing after rosuvastatin administration. The mRNA and protein levels of Apo J in carotid arteries were significantly upregulated after rosuvastatin administration as compared with the model group, and reached maximum values at 2 weeks, which was earlier than in the model group (3 weeks).

**Conclusion:** Apo J served as an acute phase reactant after balloon injury in rat carotid arteries. Rosuvastatin may reduce the neointima formation through up-regulation of Apo J. Our results suggest that Apo J exerts a protective role in the restenosis after balloon-injury in rats. (Arq Bras Cardiol. 2018; 111(4):562-568)

**Keywords:** Coronary Artery Disease; Percutaneous Coronary Intervention; Rosuvastatin Calcium; Apolipoprotein J; Coronary Restenosis; Rats.

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

Correspondência: Qin Qin •

Nº. 261 Taierzhuang South Road, Jinnan District, Tianjin. 300222, Tianjin – China

E-mail: qinqintj@163.com

Artigo recebido em 07/12/2017, revisado em 07/05/2018, aceito em 09/05/2018

DOI: 10.5935/abc.20180163

## Introdução

A doença coronária é uma das doenças cardiovasculares mais comuns, com alta morbidade e mortalidade. As principais técnicas consideradas eficazes para revascularização do miocárdio são a intervenção coronária percutânea (ICP) e a cirurgia de *bypass* coronário. A angioplastia coronária transluminal percutânea (ACTP) é um método eficaz para o tratamento da doença coronária, mas seu efeito em longo prazo é influenciado por uma alta taxa de reestenose. Apesar de *stents* farmacológicos, combinados à terapia antiplaquetária dupla, reduzirem a ocorrência de reestenose, a taxa de incidência ainda excede 10%.<sup>1,2</sup> O mecanismo da reestenose após a ICP tem sido amplamente estudado em todo o mundo, porém, alvos moleculares ou celulares eficazes para o tratamento da reestenose após ICP precisam ser identificados urgentemente.

A clusterina (CLU), ou apolipoproteína (Apo) J, é uma glicoproteína heterodimérica composta por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas por uma ponte dissulfeto.<sup>3,4</sup> O gene que codifica a Apo J está localizado no cromossomo 8p21-p12, e codifica duas principais isoformas – CLU secretória (CLUs) e CLU nuclear (CLU).<sup>5</sup> Estudos prévios relataram que a Apo J é induzida durante a progressão da reestenose pós-angioplastia e da aterosclerose.<sup>6-9</sup> No entanto, o papel da Apo J na hiperplasia neointimal é ainda controverso. Há estudos relatando que a Apo J pode estimular a proliferação e a migração de células do músculo liso vascular (CMLV) em ratos *knockouts* para CLU inibindo a expressão de p53 e p21, e promover reestenose.<sup>10,11</sup> Por outro lado, Kim et al.<sup>12</sup> revelaram que a superexpressão de CLUs pode inibir a migração e a proliferação de CMLV e inibir a apoptose celular. Em vista dos resultados controversos, nosso objetivo foi elucidar o papel da Apo J na hiperplasia neointimal, usando a artéria carótida de ratos *in vivo*, com ou sem administração de rosuvastatina.

## Métodos

### Animais

Ratos Wistar machos pesando 350-400g foram divididos aleatoriamente em três grupos – grupo controle (n = 20), grupo modelo (n = 20) e grupo intervenção (estatina) (n = 32). Os ratos de todos os grupos foram então divididos aleatoriamente em 4 grupos conforme momento de avaliação após lesão induzida com balão –1, 2 3 ou 4 semanas. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital de tórax Tianjin.

### Lesão com balão

Os ratos foram pesados no dia da cirurgia e divididos aleatoriamente em três grupos. No grupo intervenção, os ratos receberam 10mg/kg de rosuvastatina. Um cateter de Fogarty 2F foi introduzido para induzir lesão vascular como descrito anteriormente.<sup>13</sup> Em resumo, os ratos foram anestesiados após injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% na dose 0,3 mL/100 g de peso corporal. Um cateter balão 2F foi inserido na artéria carótida, saída para a aorta. O balão foi então inflado, desinflado, e puxado para trás três vezes para expor o endotélio.

Após 1, 2, 3 ou 4 semanas, os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% na dose 0,3 mL/100 g de peso corporal e sacrificados após a 4ª semana administrando-se 2-3mL de solução de cloreto de potássio via veia subclávia. A artéria carótida direita foi removida; 0,3 cm foi fixada em formalina neutra a 10% para análise patológica, e a outra parte imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para análise futura.

### Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

As amostras do vaso foram fixadas em solução de formaldeído por 3-4 horas. Foram realizadas hidratação e inclusão em parafina de rotina. As seções foram cortadas uniformemente em uma espessura de 4  $\mu$ m. A lesão dos vasos sanguíneos foi analisada em microscópio.

### Teste de imuno-histoquímica (IHQ)

Os níveis de Apo J foram avaliadas por IHQ na artéria carótida do rato. O anticorpo primário (IgG de coelho anti-Apo J humano) foi comprado da empresa Santa Cruz, Inc. (número no catálogo sc-8354). O anticorpo secundário (anticorpo produzido em cabra anti IgG de rato/coelho) foi adquirido da empresa Maixin BioTech (Fuzhou, China). Todas as fotos foram capturadas e salvas usando o sistema ISCapture, e a coleta e análise de dados realizadas pelo programa de processamento de imagens Image Pro Plus 6.

### Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Amostras de sangue venoso foram coletadas e centrifugadas a 3000r/min. O sobrenadante foi coletado usando uma micropipeta e armazenado em geladeira a -20°C. As amostras foram então descongeladas à temperatura ambiente para serem submetidas ao ELISA, o qual foi realizado usando um kit comercial (Rat Competitive ELISA for Apolipoprotein J A 252 SC) seguindo instruções do fabricante.

### Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (Real-time PCR)

Os níveis de mRNA da Apo J foram detectadas por PCR em tempo real na artéria carótida do rato. O RNA foi extraído pelo método de extração em fase única com reagente Trizol, e realizada transcrição reversa. Os primers usados para amplificação da Apo J foram: *forward*, TAA GGA GAT TCA GAA CGC CG; *reverse*, ATC CCT GGT GTC ATC TAG AG. Os primers para o controle GAPDH foram: *forward*, GTG ATG CTG GTG CCG AGT AG; *reverse*, GGT GGC AGT GAT GGC GTG C. As reações de PCR em tempo real foram preparadas seguindo as instruções do sistema SYBR®*Premix Ex Taq*<sup>TM</sup> (Perfect Real Time). Os níveis de mRNA em cada amostra foram calculados como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### Western blotting

As proteínas foram extraídas de 30mg da artéria carótida de ratos. Em resumo, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE com gel de separação a 10% e gel concentrado a 5%. Em seguida, as proteínas separadas foram transferidas para membranas PVDF (fluoreto de polivinilideno). As membranas foram bloqueadas

e incubadas com anticorpos. Níveis relativos de Apo J foram analisados pelo programa de análise Image Lab. Beta-actina foi usada como controle. As bandas foram quantificadas pelo programa QUANTITY ONE (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SPSS 20.0. Dados quantitativos foram expressados por média  $\pm$  desvio padrão (DP). Diferenças entre os dois grupos foram comparadas pelo teste t para amostras independentes. Comparações entre três grupos foram analisadas pela análise de variância simples (*one-way ANOVA*). Um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## Resultados

### Taxas de sobrevida e de sucesso do modelo

Entre os 52 ratos do grupo modelo e do grupo intervenção, 2 ratos morreram durante a operação por asfixia, e 2 morreram por hemorragia arterial 12 horas após operação. Portanto, 47 ratos sobreviveram, com uma taxa de sobrevida aproximada de 90%. O exame patológico mostrou hiperplasia e espessamento da camada íntima no grupo experimental, sugerindo que o modelo foi construído com sucesso. O tempo médio de operação foi de  $34,19 \pm 6,09$  min. A taxa de viabilidade e de sucesso do modelo deste modelo pode ter alta reprodutibilidade se os procedimentos cirúrgicos forem realizados adequadamente.

### Níveis de Apo J sérico

Não houve diferença significativa nos níveis séricos de Apo J antes e após a operação no grupo intervenção (Tabela 1). Não houve diferença significativa nos níveis séricos de Apo J na 1ª, 2ª, 3ª ou 4ª semana antes ( $F = 1,002$ ,  $p = 0,408$ ) ou após ( $F = 0,189$ ,  $p = 0,903$ ) o procedimento.

### Intervenção com estatina inibiu hiperplasia intimal

Os resultados da avaliação patológica mostraram que não houve hiperplasia intimal no grupo controle (Figura 1). No grupo modelo e no grupo intervenção, a camada íntima estava ligeiramente espessada 1 semana após a operação, e ainda mais

espessada 2 semanas após a operação. Durante 3 semanas após o procedimento, o grau de hiperplasia intimal aumentou no grupo modelo; no entanto, essa mudança não foi tão marcante como a observada na semana 2 após a operação, e as células tornaram-se paralelas gradualmente. 4 semanas após a operação, o grau de hiperplasia intimal agravou-se no grupo modelo, mas não foram observadas mudanças significativas quanto ao grau de hiperplasia intimal em comparação à semana 3 (Figura 2 e 3).

As áreas das camadas íntima e média foram medidas usando o Image Pro Plus 6, e a razão área íntima/média (íntima/média, I/M) foi usada para indicar o grau de hiperplasia intimal. Como mostrado na Tabela 2, a I/M foi próxima a 0 no grupo controle e foi significativamente diferente da I/M no grupo modelo e no grupo intervenção em todos os tempos (1, 2, 3 e 4 semanas). Não houve diferenças significativas da I/M entre os diferentes tempos no grupo modelo, e a I/M alcançou o valor máximo na quarta semana. Não foi observada diferença de I/M no grupo intervenção entre as semanas 2, 3 e 4 pós-cirurgia no grupo intervenção, e I/M no grupo intervenção foi significativamente mais baixa que aquela no grupo modelo (Tabela 2). Nossos resultados, como um todo, sugerem que a intervenção com rosuvastatina poderia inibir de maneira significativa a hiperplasia intimal em ratos.

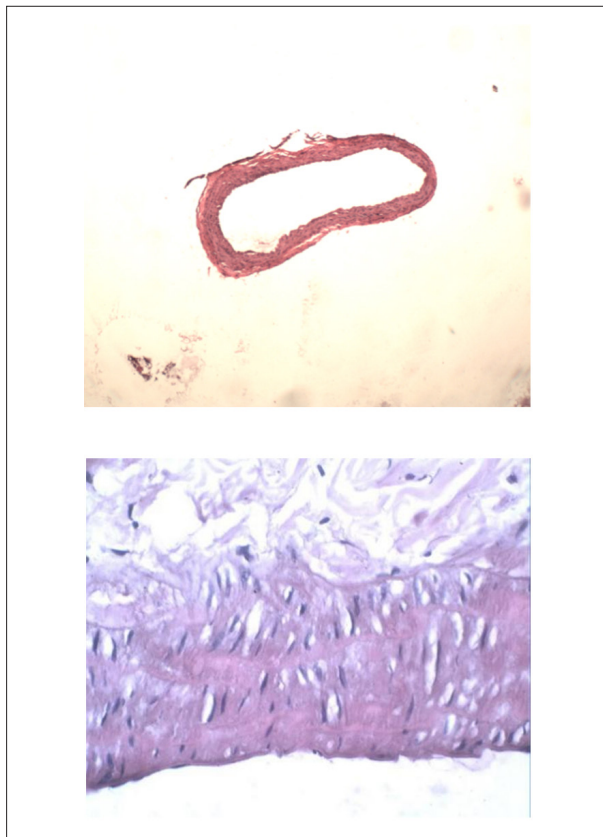
### Níveis de Apo J nas artérias carótidas

Os níveis de mRNA de Apo J foram medidos por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que o nível de mRNA de Apo J sofreu um grande aumento 2 semanas após a cirurgia, atingiu o pico na terceira semana, e diminuiu na quarta semana pós-cirurgia no grupo modelo. No grupo intervenção, o nível de mRNA de Apo J sofreu um grande aumento e atingiu o pico na semana 2, diminuindo nas semanas 3 e 4 pós-cirurgia no grupo intervenção. Além disso, o nível de mRNA de Apo J foi maior no grupo intervenção que no grupo modelo na primeira semana pós-operação. Na segunda semana pós-cirurgia, o nível de mRNA de Apo J aumentou consideravelmente em ambos os grupos, e foi significativamente mais alto no grupo intervenção que no grupo modelo (Tabela 3). Resultados similares foram observados nos níveis de proteína de Apo J como mostrado na Figura 4. Nossos resultados mostraram que a rosuvastatina aumentou de maneira significativa a expressão de Apo J nas artérias carótidas de ratos lesionadas com balão.

**Tabela 1 – Níveis séricos de apolipoproteína J (Apo J) antes e após a operação no grupo intervenção**

Time points	Pré-operação		Pós-operação		t'	p#
	n	Apo J	n	Apo J		
1	7	13,498 $\pm$ 3,015	7	10,317 $\pm$ 3,567	1,802	0,097
2	7	14,062 $\pm$ 4,538	7	11,516 $\pm$ 1,762	1,383	0,192
3	8	11,234 $\pm$ 2,740	8	11,117 $\pm$ 3,104	0,08	0,937
4	8	14,143 $\pm$ 4,609	8	11,205 $\pm$ 3,579	1,424	0,176
F <sup>S</sup>		1,002		0,189		
P#		0,408		0,903		

\* teste t para comparar diferença entre os dois momentos. #p < 0.05 considerado estatisticamente significativo. É uma análise de um só grupo – Grupo Intervenção



**Figura 1** – Coloração de hematoxilina-eosina (HE) no grupo controle. Aumento de 40x (acima) e de 400x (abaixo).



**Figura 2** – Coloração de hematoxilina-eosina (HE) no grupo modelo e no grupo intervenção controle em 1 semana (sem), 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas após lesão com balão de artérias carótidas de ratos; aumento de 40x.

## Discussão

No presente estudo, encontramos que a I/M aumentou após a lesão com balão e atingiu o valor máximo na quarta semana no grupo modelo; além disso, I/M estava aumentada na semana 2 e tal aumento cessou após administração de rosuvastatina. Nossos resultados sugerem que a rosuvastatina pode reduzir significativamente o grau de hiperplasia intimal nas artérias carótida lesionadas com balão em ratos. Os níveis do mRNA e de proteína da Apo J nas artérias carótidas foram aumentados pela rosuvastatina quando comparados ao grupo modelo, atingindo o máximo na segunda semana, mais cedo que no grupo modelo. Nossos resultados sugerem que a rosuvastatina pode inibir a hiperplasia intimal pelo aumento de Apo J após lesão com balão em ratos.

Estudos relataram que a Apo J está intimamente relacionada a doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose e reestenose após angioplastia.<sup>14,15</sup> Ishikawa et al.<sup>7</sup> apresentaram a distribuição de Apo J na matriz extracelular da camada íntima da aorta aterosclerótica de humanos, e seu potencial papel protetor na aterosclerose por meio do transporte de colesterol da parede aórtica para o fígado. A Apo J está aumentada na lesão tissular e estresse celular e tem uma função vital na proteção contra estresse oxidativo, lise celular e morte celular apoptótica.<sup>16-21</sup> Além disso, observou-se Apo J

na remodelagem ativa do tecido. Esses achados indicam que a Apo J pode atuar como um reagente de fase aguda. No presente estudo, observamos um espessamento marcante da camada neointima duas semanas após a cirurgia, com proliferação e migração de CMLV identificadas por coloração de HE no grupo modelo. A proliferação e a migração de CMLV foram mais ativas na terceira semana após cirurgia, e diminuíram na quarta semana. Ao mesmo tempo, os níveis de mRNA e de proteína da Apo J aumentaram significativamente na semana 2, alcançou um pico na terceira semana após operação, e diminuiu na quarta semana. Os resultados mostraram alta expressão de Apo J na fase de proliferação ativa e migração de CMLV. Consistente com outros estudos, nossos resultados sugerem que a Apo J pode ser um reagente de fase aguda após lesão com balão nas artérias carótidas de ratos.

Reestenose de *stent* após procedimentos intervencionistas tornou-se um dos problemas mais urgentes a serem resolvidos em todo o mundo. A rosuvastatina, um potente inibidor da enzima HMG-CoA (hidroximetilglutaril-CoA) redutase, parece reduzir o espessamento neointimal após lesão endotelial vascular em ratos. No presente estudo, os ratos do grupo intervenção receberam administração intragástrica de rosuvastatina (10 mg/kg/d). De acordo com outros estudos,<sup>22-24</sup> encontramos que a rosuvastatina reduziu significativamente a formação de neointima.

Estudos prévios relataram que a isoforma secretada da Apo J (CLUs) pode inibir a proliferação e a migração de CMLV.<sup>12,25</sup> Kim et al.<sup>12</sup> também relataram que a Apo J poderia inibir significativamente a hiperplasia neointimal por meio da superexpressão de Apo J mediada por adenovírus em ratos. Em nosso estudo, observamos que níveis de mRNA e proteína da Apo J nas artérias carótidas aumentaram após a administração de rosuvastatina em comparação ao grupo controle. Ainda, a Apo J atingiu o máximo na segunda semana após a administração de rosuvastatina, e tal fato ocorreu mais cedo em comparação ao grupo modelo (terceira semana).

Esses resultados sugerem que a rosuvastatina pode aumentar os níveis de Apo J nas artérias carótidas com lesões induzidas por balão, o que indiretamente indica que a Apo J exerce função protetora contra reestenose após lesão por balão em ratos.

## Conclusão

Nossos resultados mostraram que a Apo J serviu como um reagente de fase aguda após lesão nas artérias carótidas de ratos induzida por balão. A rosuvastatina pode reduzir a formação de neointima pelo aumento nos níveis de Apo J. Nossos resultados sugerem que a Apo J exerce papel protetor contra reestenose após lesão por balão em ratos.

## Agradecimentos

Agradecemos muito o Instituto de Pesquisa sobre Doença Cardiovascular (*Cardiovascular Disease Research Institute*) de Tianjin pela ajuda no experimento com os animais.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Yang N, Qin Q; Obtenção de dados: Yang N, Dong B, Yang J, Li Y, Kou L, Liu Y; Análise e interpretação dos dados: Yang N, Dong B, Yang J, Li Y, Kou L; Análise estatística: Yang N, Dong B; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Yang N, Dong B, Yang J, Li Y, Qin Q

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Comissão de Saúde e Planejamento Familiar Ciência e Tecnologia (Health and Family Planning Commission, Science and Technology) de Tianjin (concessão/prêmio número 2015KR07), e Indústria da Saúde de Tianjin (Tianjin Health Industry) (concessão/ prêmio número 13KG131).

## Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

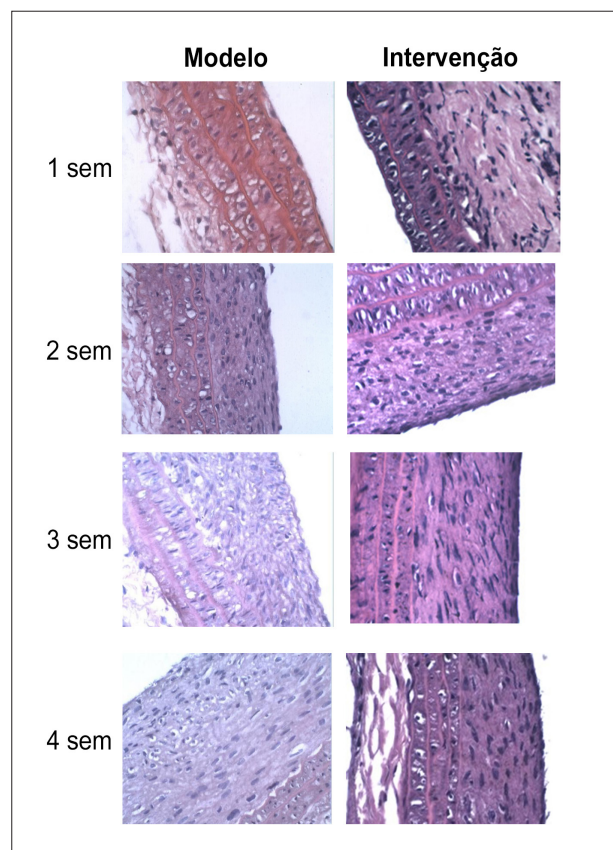


Figura 3 – Coloração de hematoxilina-eosina (HE) no grupo modelo e no grupo intervenção controle em 1 semana (sem), 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas após lesão com balão de artérias carótidas de ratos; aumento de 400 x.

Tabela 2 – Razão área íntima/média (I/M) nos grupos do estudo

Tempos	Grupo controle		Grupo modelo		Grupo intervenção		t*	p#
	n	I/M	n	I/M	n	I/M		
1	5	0,04 ± 0,07	5	0,63 ± 0,40 <sup>y</sup>	5	0,42 ± 0,04 <sup>y</sup>	10,066	< 0,001
2	5	0,01 ± 0,02	4	1,08 ± 0,29 <sup>A</sup>	4	1,29 ± 0,31 <sup>AA</sup>	39,639	< 0,001
3	5	0,03 ± 0,03	4	1,81 ± 0,11 <sup>AB</sup>	4	1,47 ± 0,54 <sup>AB</sup>	37,142	< 0,001
4	5	0,05 ± 0,04	4	2,61 ± 1,12 <sup>ABb</sup>	4	1,50 ± 0,26 <sup>ABc</sup>	20,287	< 0,001
F <sup>S</sup>		0,741		9,432		21,393		
P <sup>#</sup>		0,543		< 0,001		< 0,001		

\* teste t para comparar diferença entre os dois grupos; <sup>S</sup> valor F calculado usando análise de variância simples (one-way ANOVA) para comparar a diferença entre os três grupos; #p < 0.05 considerado estatisticamente significativo.

Tabela 3 – Níveis relativos (2-ΔΔCt) de mRNA da apolipoproteína J

Tempos	Grupo controle		Grupo modelo		Grupo intervenção		t'	p#
	n	2-ΔΔCt	n	2-ΔΔCt	n	2-ΔΔCt		
1	5	0,958 ± 0,251	5	0,641 ± 0,296	6	1,275 ± 0,468 <sup>a</sup>	4,212	0,039
2	5	0,948 ± 0,090	4	7,804 ± 1,328 <sup>aa</sup>	6	10,040 ± 2,086 <sup>ab</sup>	52,279	< 0,001
3	5	1,004 ± 0,196	4	8,011 ± 2,306 <sup>ab</sup>	6	7,327 ± 2,869 <sup>a*#</sup>	15,31	< 0,001
4	5	1,048 ± 0,349	4	3,429 ± 1,119 <sup>abc</sup>	6	2,413 ± 0,492 <sup>#b</sup>	14,212	0,001
F <sup>s</sup>		0,182		29,266		31,336		
P <sup>#</sup>		0,907		< 0,001		< 0,001		

<sup>a</sup> teste t para comparar diferença entre os dois grupos; <sup>s</sup> valor F calculado usando análise de variância simples (one-way ANOVA) para comparar a diferença entre os quatro grupos; <sup>#</sup>P < 0.05 considerado estatisticamente significativo.

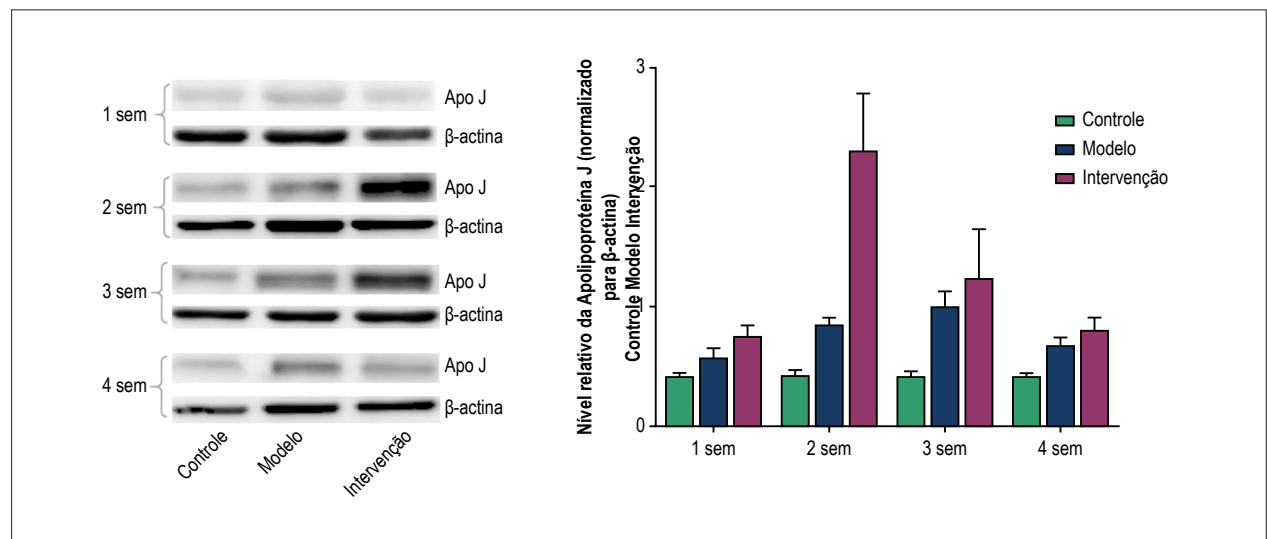


Figura 4 – Western blotting dos níveis de proteína da apolipoproteína J (Apo J) 1 semana (sem), 2 semanas, 3 semanas e 4 semanas após lesão com balão de artérias carótidas de ratos.

#### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em

Experimentação Animal do Tianjin Chest Hospital sob o número de protocolo 2015-006-05.

#### Referências

- Sharma PK, Chhatriwalla AK, Cohen DJ, Jang JS, Baweja P, Gosch K, et al. Predicting long-term bleeding after percutaneous coronary intervention. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2017;89(2):199-206.
- Lee JY, Park DW, Kim YH, Yun SC, Kim WJ, Kang SJ, et al. Incidence, predictors, treatment, and long-term prognosis of patients with restenosis after drug-eluting stent implantation for unprotected left main coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(12):1349-58.
- Shannon B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W, Reichrath J. Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control. *J Mol Histol.* 2006;37(5-7):183-8.
- Trougakos IP, Gonos ES. Regulation of clusterin/apolipoprotein J, a functional homologue to the small heat shock proteins, by oxidative stress in ageing and age-related diseases. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1324-34.
- Park S, Mathis KW, Lee IK. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014;15(1):45-53.
- Gelissen IC, Hochgrebe T, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Jessup W, Dean RT, et al. Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function? *Biochem J.* 1998;331(Pt 1):231-7.
- Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Komiyama K, Masuda S, Asuwa N, et al. Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(4):665-72.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Wagner AC, Hama S, et al. An oral apoJ peptide renders HDL antiinflammatory in mice and monkeys and dramatically reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(9):1932-7.

9. Miyata M, Biro S, Kaieda H, Eto H, Orihara K, Kihara T, et al. Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation*. 2001;104(12):1407-12.
10. Millis AJ, Luciani M, McCue HM, Rosenberg ME, Moulson CL. Clusterin regulates vascular smooth muscle cell nodule formation and migration. *J Cell Physiol*. 2001;186(2):210-9.
11. Shirasawa T, Miyata M, Eto H, Hamada N, Akasaki Y, Miyauchi T, et al. Deficiency of clusterin inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(6):772-81.
12. Kim HJ, Yoo EK, Kim JY, Choi YK, Lee HJ, Kim JK, et al. Protective role of clusterin/apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1558-64.
13. Preusch MR, Vanakaris A, Bea F, Ieronimakis N, Shimizu T, Konstandin M, et al. Rosuvastatin reduces neointima formation in a rat model of balloon injury. *Eur J Med Res*. 2010;15(11):461-7.
14. Garcia-Rodriguez S, Arias-Santiago S, Perandres-Lopez R, Orgaz-Molina J, Castellote L, Buendia-Eisman A, et al. Decreased plasma levels of clusterin in patients with psoriasis. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(6):497-503.
15. Yanni AE, Agrogiannis G, Gkekas C, Perrea D. Clusterin/Apolipoprotein J immunolocalization on carotid artery is affected by TNF-alpha, cigarette smoking and anti-platelet treatment. *Lipids Health Dis*. 2014 Apr 23;13:70.
16. Witte DP, Aronow BJ, Stauderman ML, Stuart WD, Clay MA, Gruppo RA, et al. Platelet activation releases megakaryocyte-synthesized apolipoprotein J, a highly abundant protein in atheromatous lesions. *Am J Pathol*. 1993;143(3):763-73.
17. Sivamurthy N, Stone DH, Logerfo FW, Quist WC. Apolipoprotein J inhibits the migration, adhesion, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 2001;34(4):716-23.
18. Foglio E, Puddighinu G, Fasanaro P, D'Arcangelo D, Perrone GA, Mocini D, et al. Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *Int J Cardiol*. 2015 Oct 15;197:333-47.
19. Van Dijk A, Vermond RA, Krijnen PA, Juffermans LJ, Hahn NE, Makker SP, et al. Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(10):893-902.
20. Lee YN, Shim YJ, Kang BH, Park JJ, Min BH. Over-expression of human clusterin increases stress resistance and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;420(4):851-6.
21. Pereira RM, Mekary RA, da Cruz Rodrigues KC, Anaruma CP, Ropelle ER, da Silva AS, et al. Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev*. 2018;23(1):123-9.
22. van der Harst P, Groenewegen HC, Roks AJ, Buikema H, Zijlstra F, van Gilst WH, et al. Rosuvastatin attenuates angiotensin II-induced neointimal formation after stent implantation in the rat. *Coron Artery Dis*. 2008;19(1):47-53.
23. Kappert K, Leppanen O, Paulsson J, Furuhashi M, Carlsson MA, Heldin CH, et al. Highly active antiretroviral therapy attenuates re-endothelialization and alters neointima formation in the rat carotid artery after balloon injury. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43(4):383-92.
24. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):769-75.
25. Miwa Y, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Sasaguri T. Involvement of clusterin in 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2-induced vascular smooth muscle cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319(1):163-8.

