

Larissa Ferreira dos Santos

Influência dos microRNAs nos fatores angiogênicos e
antiangiogênicos na via do fator de crescimento endotelial vascular
em pacientes com doença arterial coronariana

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria
Urbana Pinto Brandão Rondon

São Paulo
2020

Larissa Ferreira dos Santos

Influência dos microRNAs nos fatores angiogênicos e
antiangiogênicos na via do fator de crescimento endotelial vascular
em pacientes com doença arterial coronariana

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Cardiologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria
Urbana Pinto Brandão Rondon

São Paulo
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira-Santos, Larissa
Influência dos microRNAs nos fatores
angiogênicos e antiangiogênicos na via do fator de
crescimento endotelial vascular em pacientes com
doença arterial coronariana / Larissa Ferreira-
Santos. -- São Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Maria Urbana Pinto Brandão Rondon.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Doença da artéria
coronariana 3.Fluxo sanguíneo regional 4.Fatores
angiogênicos 5.Efeito antiangiogênese
6.Vasodilatação

USP/FM/DBD-279/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus amados pais
Geny Machado Ferreira e Mário José dos Santos (in memoriam)
que sempre me apoiaram e vibraram com as minhas conquistas.
Vocês são a minha fortaleza.
Muito obrigada por todo suporte, amor e carinho!!!

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora **Maria Urbana Pinto Brandão Rondon**, por todo respeito e carinho nestes anos de convivência, e acima de tudo, por dividir comigo o seu conhecimento acadêmico-científico que é imenso. Muitíssimo obrigada por tudo!!!

Ao Professor Doutor **Carlos Eduardo Negrão** pela sua ética profissional, revisões e ajudas nos trabalhos e por ter aberto as portas para que eu pudesse desenvolver meu trabalho em colaboração com a Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor. Muito obrigada!!!

À Professora Doutora **Edilamar Menezes de Oliveira** que abriu as portas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício para que eu realizasse parte dos meus experimentos e por toda ajuda acadêmica-científica e discussões acerca do projeto, e ao longo de todos esses anos. Muito obrigada!!!

Ao Professor Doutor **Tiago Fernandes** por ser tão paciente e por sempre estar por perto. Obrigada por ajudar tanto nesta tese e em vários experimentos. Muito obrigada por tudo e por também estar comigo na diretoria do Departamento de Educação Física e Esporte da SOCESP no biênio 2020-2021!!!

Ao Professor Doutor **Luiz Antônio Machado César** por compartilhar os pacientes do ambulatório de Coronariopatia Crônica do InCor para a realização dessa tese e pelos conselhos na qualificação. Obrigada por ser tão gentil!!!

À Professora Doutora **Ligia de Moraes Antunes Corrêa** pelo companheirismo e amizade no InCor e também por estar junto comigo na diretoria do Departamento de Educação Física e Esporte da SOCESP no biênio 2018-2019. Muito obrigada!!!

Aos meus irmãos e sobrinhos lindos, **Karina, Bruno, Igor, Maria Luiza, Lorena e João Pedro**, e amigos mais que queridos, **Suzana Dutra, Mila Alvarenga, André Costa e Rodrigo Costa** por tantos anos de amizade, respeito e apoio incondicional. Obrigada por serem os melhores irmãos, sobrinhos e amigos, e por dividirem as alegrias e tristezas da vida comigo.

Aos companheiros e amigos do LACAC, **Carlos Alcino Filho, Graziela Vicente-Amaro, Verônica Lopes e Edna Silva** por compartilharem o dia a dia no laboratório e experimentos comigo. Obrigada pelo suporte, apoio e compreensão de vocês. Sem vocês este trabalho não teria acontecido. MUITÍSSIMO obrigada!!!!!!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da EEFE, **Tiago, João Lucas, Úrsula Soci, Vanessa, Matheus, Lucas, Noemy, Camila, Marcelo e Úrsula Urias**, obrigada por toda a ajuda nos experimentos, pelos almoços, cafés, bate-papos e, às vezes, procrastinação com café!!! Rsrs Obrigada a todos vocês!!!!

Aos queridos colegas, ex-colegas e amigos do InCor, **Camila Jordão, Francis Ribeiro, Allan Sales, Raphaela Ghosers, Kelly Correia, Marcel Costa, Marcelo dos Santos, Guilherme Fonseca, Sara Rodrigues, Adriana Sarmiento, Luciene Azevedo, Thais Nobre, Patrícia Trevizan e Denise Lobo**, obrigada por me acompanharem nesta jornada e por toda a ajuda nesses anos.

Aos médicos da Unidade de Reabilitação e Fisiologia do Exercício, **Marcel Costa, Maria Janieire Alves, Patrícia Oliveira, Amanda Rodriguez, Fabiana Rodas e Ana Maria Braga**, obrigada pela atenção e cuidado com os pacientes!

Aos **professores de educação física, à Glauce (nutricionista), e aprimorandos** da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício. Obrigada pela convivência tão prazerosa na unidade.

Às secretárias da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, **Mônica, Sandrinha, Rô, Fabi e Elaine** pelo respeito e trabalho durante esses anos de convivência.

Aos meus supervisores no *Dalton Cardiovascular Research Center* na Universidade do Missouri, Estados Unidos, Professores Doutores **Jaume Padilla e Luis Arturo Martinez-Lemus** pelo exemplo de dedicação, competência e excelência no que fazem. Muito obrigada por abrirem as portas do laboratório e por todos os ensinamentos. E aos colegas que dividiram a bancada do laboratório comigo **Helena, Thomas, Zach, Thaysa, Mari, Francisco, Christopher e Makenzie**, obrigada por todo aprendizado e

acolhimento durante o doutorado sanduíche. E em especial ao Professor Doutor **Michael A. Hill** e a Professora Doutora **Camila Manrique-Acevedo** sempre presente nas reuniões semanais contribuindo com os nossos projetos. Foi uma excelente experiência e aprendizado com pessoas muito gentis e que acrescentaram muito a minha formação científica.

À Pós-Graduação do programa de Cardiologia, representada brilhantemente pela **Neusa, Luana, Juliana, Mônica, Valdecira e Sidnei**. Obrigada por me orientarem de forma paciente e amiga ao longo desses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo o suporte financeiro para o projeto, pelas bolsas de estudos no país (#2017/24605-0) e no exterior (BEPE, #2018/18854-0) e incentivo à pesquisa. Com certeza o aprendizado foi imenso e sem a FAPESP isso não teria acontecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro, bolsas de estudo e incentivo à pesquisa.

À Universidade de São Paulo (USP), ao Instituto do Coração (InCor) do HCFMUSP e a Escola de Educação Física e Esporte (EEFE) que possibilitaram a realização do meu trabalho de Doutorado.

E em especial, aos **voluntários** que participaram da pesquisa. Sem vocês este trabalho não seria realizado. MUITÍSSIMO Obrigada!

*“Coloque energia em tudo que você faz,
pois assim atingirá o seu objetivo.
Nunca esqueça dos seus valores e do que te faz feliz.
Seja feliz.”*

Mário José dos Santos

*“A vida não se mede pelo número
de vezes que respiramos,
mas sim pelos extraordinários e importantes
momentos que vivemos com plenitude.”*

George Carlin

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1-INTRODUÇÃO	2
2-OBJETIVOS	18
3-HIPÓTESES	20
4-MÉTODOS E MATERIAIS	22
4.1 Desenho do estudo	22
4.2 Critérios de inclusão	23
4.3 Critérios de exclusão	24
4.4 Avaliação clínica inicial	24
4.5 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca.....	24
4.6 Avaliação da Função Cardíaca.....	25
4.7 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Periférico	26
4.7.1 Fluxo braquial e femoral	26
4.7.2 Fluxo sanguíneo muscular (FSM).....	27
4.8 Avaliação dos miRNAs circulantes (coleta e extração)	29
4.9 Avaliação dos miRNAs teciduais e da expressão dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos	30
4.9.1 Biópsia do Músculo Esquelético	31
4.9.2 Expressão de miRNAs e genes (mRNAs)	32

4.9.3 Expressão de proteínas (Western Blotting)	38
4.10 Protocolos experimentais com exercício isométrico.....	40
4.11 Análise Estatística	41
5-RESULTADOS	44
5.1 Características físicas, funcionais, laboratoriais e clínicas.....	45
5.2 Expressão dos miRNAs circulantes e teciduais	48
5.3 Expressão gênica e proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético	50
5.3.1 Expressão gênica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético	50
5.3.2 Expressão proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético	52
5.4 Características hemodinâmicas e vasculares	56
5.4.1 Repouso.....	56
5.4.2 Durante o exercício	57
5.5 Padrão de fluxo (shear rate) na artéria braquial e femoral em repouso	60
5.5.1 Experimento na artéria braquial.....	60
5.5.2 Experimento na artéria femoral	62
5.6 Associação dos miRNAs com os fatores angiogênicos e antiangiogênicos	63
5.7 Associação dos miRNAs com o fluxo sanguíneo periférico.....	66
6-DISCUSSÃO	76
6.1 Perfil de expressão dos miRNAs e alterações moleculares	77
6.2 Fluxo sanguíneo periférico	85
7-CONCLUSÕES	90
8-LIMITAÇÕES.....	92
9-PERSPECTIVAS	94

10-ANEXO..... 96

11-REFERÊNCIAS 99

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

3'-UTR	Região 3' não traduzida
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
Bad	Agonista de morte celular associado a Bcl-2
Bax	Proteína x associada a Bcl-2
Bcl-2	Linfoma de células B2
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Controle saudável
CVA	Condutância vascular do antebraço
CVP	Condutância vascular da perna
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPC	Água tratada com Dietil Pirocarbonato
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA	Double-stranded RNA
EC	Célula endotelial
ECG	Eletrocardiograma
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinases de regulação de sinal extracelular
FC	Frequência cardíaca

FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FSP	Fluxo sanguíneo periférico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KLF2	Fator 2 do tipo Krüppel
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
miR ou miRNA	microRNA
MEK	Quinase com dupla especificidade
MP	Micropartículas
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDCD4	Proteína 4 da morte celular programada

PetO ₂	Pressão parcial de oxigênio no final da expiração
PetCO ₂	Pressão parcial de CO ₂ no final da expiração
pre-miRNA	microRNA precursor
pri-miRNA	microRNA primitivo
PI3K	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI3KR2	Subunidade regulatória 2 do fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
RanGTP	Proteína guanosina trifosfato nuclease relacionada a Ras
Raf	Proteína treonina quinase
RER	Razão de troca respiratória
RNA	Ácido ribonucleico
RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RT-qPCR	Análise quantitativa da transcriptase reversa e reação em cadeia de polimerase em tempo real
RVP	Resistência vascular periférica
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
Spred-1	<i>Sprouty related EVH1 domain containing 1</i>
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR-1	Receptor 1 do VEGF
VEGFR-2	Receptor 2 do VEGF
VO ₂ pico	Consumo de oxigênio no pico do exercício
VE/VCO ₂	Equivalente ventilatório de CO ₂
VE/VO ₂	Equivalente ventilatório de O ₂
VSMC	Célula do músculo liso vascular

Unidades

bpm	Batimento por minuto
C	Celsius
cm	Centímetro
cm/s	Centímetro por segundo
kg	quilograma
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm Hg	Milímetros de mercúrio
min	Minuto
pg/mL	Picograma por mililitro
seg	Segundos
ua	Unidades arbitrárias
μl	Microlitro
W/min	Watts por minuto
μg/mL	Micrograma por mililitro

Lista de Figuras

- Figura 1. A doença arterial coronariana (DAC) associada à presença de fatores de risco, aumenta o estado inflamatório celular levando à diminuição da integridade vascular e da angiogênese e ao aumento da disfunção endotelial, o que irá impactar diretamente na redução do fluxo sanguíneo. VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; NO, óxido nítrico; EROs, espécies reativas de oxigênio. Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art¹⁰. 4
- Figura 2. Biogênese do miRNA e seus mecanismos de ação no núcleo e citoplasma. Desenho criado com a ajuda do programa BioRender⁵⁵. 10
- Figura 3. Esquema representativo dos miRNAs e seus alvos de interesse na via do VEGF. Regulação da angiogênese por diferentes vias de sinalização PI3K/Akt/eNOS e RAF/MEK/ERK. O miRNA-126 regula diretamente PI3KR2 e Spred-1, o miRNA-16 regula diretamente VEGF, VEGFR2 e Bcl-2, o miRNA-21 regula indiretamente Bcl-2 e eNOS, e o miRNA-92a regula indiretamente a eNOS. PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato; Akt, proteína quinase B; eNOS, enzima óxido nítrico sintase endotelial; Raf-1, proteína treonina quinase; ERK, quinase de regulação de sinal extracelular; MEK, quinase com dupla especificidade; PI3KR2, subunidade regulatória dois da PI3K; Spred-1, proteína relacionada a brotamento; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR2, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular; Bcl-2, linfoma de células B2; KLF2, fator 2 do tipo Krüppel; PTEN, homólogo de fosfatase e tensina. Os fatores destacados em preto fazem parte da regulação antiangiogênica da via, enquanto que os demais fatores apresentados são angiogênicos. Desenho criado com a ajuda do programa BioRender⁵⁵. 14
- Figura 4. Avaliação da pressão arterial pelo método oscilométrico indireto a cada minuto (DIXTAL, modelo DX 2022). 25
- Figura 5. Exame com Doppler da artéria braquial (à esquerda). Imagem representativa de um vaso e medida do fluxo anterógrado (à direita) 27
- Figura 6. Avaliação do fluxo sanguíneo muscular por pletismografia de oclusão venosa. A) Fluxo sanguíneo medido no antebraço. B) Fluxo sanguíneo

medido na panturrilha. C) Equipamento utilizado para a medida do fluxo (AI6; Hokanson, WA, EUA).	28
Figura 7. Análise dos miRNAs circulantes através do <i>PAXgene Blood miRNA Kit</i> . O RNA foi purificado utilizando uma tecnologia à base de sílica em formato de coluna de rotação.	30
Figura 8. Biópsia do músculo vasto-lateral. A) Após a anestesia local, a agulha foi posicionada no local da incisão. B) Preparação para a retirada do fragmento muscular com a ajuda de seringa para sugar o músculo para dentro da agulha e permitir pequeno corte. C) Separação do músculo para posterior armazenamento no freezer -80°C.	32
Figura 9. Técnica de verificação da concentração total de RNA através do espectrofotômetro NanoDrop.	33
Figura 10. Técnica de verificação da integridade das amostras realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.	34
Figura 11. Processo de quantificação de miRNAs e genes (mRNA) do músculo vasto lateral e miRNAs do sangue total utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art ¹⁰	38
Figura 12. Processo de quantificação das proteínas do músculo vasto lateral utilizando a técnica de <i>western blotting</i> . Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art ¹⁰	39
Figura 13. Sequências dos protocolos experimentais 1 e 2. CVM, contração voluntária máxima; FSM, fluxo sanguíneo muscular; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.	41
Figura 14. Gráfico demonstrativo da inclusão e exclusão de participantes no protocolo. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana.	44
Figura 15. Dados individuais (Painel superior) e valores médios (Painel inferior) da expressão de miRNAs-126, -16, -21 e -92a circulantes no sangue total, nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. * =p< 0,05 vs. CS; ** =p< 0,01 vs. CS; NS= diferença estatisticamente não significativa.	48

- Figura 16. Dados individuais (Painel superior) e valores médios (Painel inferior) da expressão de miRNAs-126, -16, -21 e -92a teciduais, nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$ vs. CS; NS= diferença estatisticamente não significativa..... 49
- Figura 17. Dados individuais e valores médios da expressão gênica tecidual dos fatores antiangiogênicos PI3KR2 (Painel A) e iNOS (Painel B); e do fator angiogênico de sobrevivência celular Bcl-2 (Painel C) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). *= $p < 0,05$ vs. CS. 51
- Figura 18. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores antiangiogênicos iNOS (Painel A), PI3KR2 (Painel B) e apoptótico Bad (Painel C) e os *blots* representativos de cada proteína (Painel D) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). * = $p < 0,05$ vs. CS. 53
- Figura 19. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores angiogênicos VEGF-A (Painel A), VEGFR-2 (Painel B), PI3K (Painel C), p-Akt/Akt total (Painel D), p-eNOS/eNOS (Painel E) e os blots representativos de cada proteína (Painel F) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). * = $p < 0,05$ vs. CS. 54
- Figura 20. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores angiogênicos e de sobrevivência celular, c-Raf (Painel A), p-ERK1/2/ERK1/2 total (Painel B), Bcl-2 (Painel C), HIF-1 α (Painel D) e blots representativos de cada proteína (E) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). * = $p < 0,05$ vs. CS..... 55
- Figura 21. Condutância vascular do antebraço (CVA) durante o exercício de preensão de mão (*handgrip*) realizado a 30% da contração voluntária máxima (Painel A) e resposta ao exercício (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (C). ASC, área sob a curva. * = $P < 0,05$ vs. Repouso. † = $P < 0,05$ vs. CS. 59
- Figura 22. Condutância vascular da perna (CVP) durante o exercício de *perna* realizado a 30% da contração voluntária máxima (Painel A) e resposta ao exercício (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e

nos indivíduos controle saudáveis (C). ASC, área sob a curva. *= P <0,05 vs. Repouso. †= P <0,05 vs. CS.	60
Figura 23. Diâmetro da artéria braquial nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS).	61
Figura 24. Padrão de <i>Shear Rate</i> (SR) da artéria braquial nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (C). SR anterógrado (Painel A), SR médio (Painel B), SR retrógrado (Painel C) e SR oscilatório (Painel D). Grupo DAC (n=18), grupo C (n=10). *=p <0,05 vs. CS.	62
Figura 25. Associação entre a expressão do miRNA-126 tecidual e o seu alvo de interesse PI3KR2 nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r, correlação de Pearson.	64
Figura 26. Associação entre a expressão do miRNA-16 tecidual e os seus alvos de interesse Bcl-2 (Painel A), VEGF-A (Painel B) e VEGFR-2 (Painel C) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r, correlação de Pearson.	65
Figura 27. Associação entre a expressão do miRNA-21 tecidual e os seus alvos de interesse Bcl-2 (Painel A) e p-eNOS/eNOSTotal (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r, correlação de Pearson.	66
Figura 28. Associação entre a expressão do miRNA-92a tecidual e o seu alvo de interesse p-eNOS/eNOSTotal nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r, correlação de Pearson.	66
Figura 29. Associação entre a condutância vascular do antebraço em repouso e a expressão dos miRNAs circulantes. miRNA-126 (▲, A), miRNA-16 (●, B), miRNA-21 (■, C) e miRNA-92a (◆, D) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). rho, correlação de <i>Spearman</i>	70
Figura 30. Associação entre a reposta (A.S.C.) de condutância vascular do antebraço durante o exercício de <i>handgrip</i> e a expressão dos miRNAs circulantes. miRNA-126 (▲, A), miRNA-16 (●, B), miRNA-21 (■, C) e miRNA-92a (◆, D) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos	

controle saudáveis (CS). A.S.C., área sob a curva. rho, correlação de <i>Spearman</i>	71
Figura 31. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 4, associação dos miRNAs com a expressão proteica.	74
Figura 32. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 5, associação dos miRNAs com o fluxo sanguíneo periférico.	74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no PCR em tempo real para os genes....	36
Tabela 2. Características físicas, funcionais e laboratoriais em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	46
Tabela 3. Características clínicas e medicações em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	47
Tabela 4. Expressão gênica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do VEGF em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	52
Tabela 5. Características hemodinâmicas e vasculares em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis – Protocolo Experimental 1 (Braço).....	56
Tabela 6. Características hemodinâmicas e vasculares em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis – Protocolo Experimental 2 (Perna).....	57
Tabela 7. Características hemodinâmicas e vasculares durante o exercício de preensão de mão (handgrip) em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis.....	58
Tabela 8. Características hemodinâmicas e vasculares durante o exercício de perna em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	60
Tabela 9. Padrão de <i>shear rate</i> na artéria femoral em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis.....	63
Tabela 10. Associações entre os miRNAs circulantes (c-miRNAs) e os parâmetros das artérias braquial e femoral em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	67
Tabela 11. Associações entre os miRNAs teciduais (t-miRNAs) e os parâmetros da artéria femoral em repouso em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis	68

Tabela 12. Associações entre os miRNAs circulantes e o fluxo sanguíneo muscular do braço em repouso e durante o exercício nos pacientes com doença arterial coronariana e nos indivíduos controle saudáveis	69
Tabela 13. Associações entre os miRNAs teciduais, fluxo sanguíneo muscular e condutância vascular da perna em repouso durante o do exercício de perna nos pacientes com doença arterial coronariana e nos indivíduos controle saudáveis	72
Tabela 14. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 1, avaliação da expressão do miRNAs teciduais e circulantes, nos pacientes com DAC em relação ao CS.	72
Tabela 15. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 2, avaliação da expressão gênica e proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos, nos pacientes com DAC em relação ao CS.	73
Tabela 16. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 3, avaliação do fluxo sanguíneo periférico, nos pacientes com DAC em relação ao CS.	73

Resumo

Ferreira-Santos L. *Influência dos microRNAs nos fatores angiogênicos e antiangiogênicos na via do fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com doença arterial coronariana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A disfunção endotelial e inflamação são marcadores da doença arterial coronariana (DAC). Alguns microRNAs(miRNAs) circulantes expressos no endotélio vascular e reguladores da via da angiogênese têm sido descritos na DAC. Contudo, não é conhecida a expressão destes miRNAs localmente, na musculatura esquelética, e sua associação com o fluxo sanguíneo periférico e com os fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na DAC. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar as expressões dos miRNAs-126, -16, -21 e 92a teciduais e circulantes em pacientes com DAC, a expressão gênica e proteica tecidual dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do VEGF, avaliar o fluxo sanguíneo periférico (FSP), bem como, avaliar se a expressão dos miRNAs estava associada com o FSP e com as expressões proteicas nesses pacientes.

MÉTODOS: Vinte e dois pacientes com DAC, sem disfunção ventricular (55 ± 1 anos) e quatorze indivíduos controles saudáveis (CS) foram selecionados. Foi realizada coleta de sangue para avaliação dos miRNAs circulantes e biópsia do vasto lateral para avaliar os miRNAs teciduais e as expressões gênica e proteica. Os miRNAs e genes foram analisados por *RT-qPCR*, as proteínas por *western blotting*, e o fluxo sanguíneo periférico pelo ultrassom com Doppler (shear rate, SR) e pletismografia de oclusão venosa (fluxo sanguíneo muscular, FSM). A pressão arterial média (PAM, oscilométrica) e frequência cardíaca (FC, eletrocardiograma) foram avaliadas.

RESULTADOS: A expressão dos miRNAs teciduais -126, -16 e -21 estava reduzida no grupo com DAC comparado ao grupo CS, (72 ± 6 vs. 100 ± 10 , $p=0,03$; 72 ± 5 vs. 100 ± 11 , $p=0,03$; 66 ± 8 vs. 100 ± 11 , $p=0,04$; respectivamente). O mesmo comportamento foi observado para os miRNAs circulantes. A expressão tecidual e circulante do miRNA-92a foi semelhante entre os grupos. A expressão gênica de PI3KR2 estava aumentada ($p=0,02$), enquanto a iNOS ($p=0,02$) e Bcl-2 ($p=0,01$) estavam diminuídas na DAC em relação ao grupo CS. A expressão gênica dos demais

fatores avaliados não foram diferentes entre os grupos. Em relação à expressão proteica tecidual, os fatores Bad, Bcl-2 e VEGFR-2 estavam aumentados ($p < 0,05$), o pERK1/2/ERK1/2 estava diminuído ($p = 0,047$) e o p-Akt/Akt mostrou uma tendência ($p = 0,06$) a estar diminuído na DAC. Os demais fatores avaliados foram semelhantes entre os grupos. Em repouso, o FSM do antebraço e da perna, a condutância vascular do antebraço e da perna (CVA e CVP, respectivamente), a PAM e a FC não foram diferentes entre os grupos. Entretanto, durante o exercício de *handgrip* e de *perna* o grupo DAC apresentou menor resposta de CVA e CVP em relação ao grupo CS. O padrão de fluxo, *shear rate* (SR) anterógrado e médio das artérias braquial e femoral, foram menores no grupo DAC em relação ao grupo CS. Já, os SR retrógrado e SR oscilatório foram semelhantes entre os grupos. O miRNA-126 apresentou associação com a expressão proteica da PI3KR2 e o miRNA-16 com o VEGFR-2. Não observamos associação entre os miRNAs circulantes e os padrões de fluxo braquial e femoral. Contudo, o miRNA-92a tecidual apresentou associação com o SR anterógrado. Interessantemente, os miRNAs -126, -16 e -21 circulantes estavam associados ao FSM e a CVA de braço tanto em repouso como durante o exercício. Já, na perna, observamos somente associação entre o miRNA-16 e o FSM. CONCLUSÕES: Pacientes com DAC apresentam menor expressão dos miRNAs -126, -16 e -21 tanto circulantes quanto teciduais. Estes angiomiRs envolvidos na via do VEGF estão alterados, o que pode interferir na expressão de genes-alvo, alterando o processo de angiogênese, ativação de via apoptótica e de síntese proteica. Além disso, foi observada uma associação positiva entre os c-miRNAs -126, -16 e -21 com a CVA em repouso e durante o exercício, sugerindo dessa maneira, a influência desses angiomiRs na modulação da função vascular.

Descritores: MicroRNAs; Doença da artéria coronariana; Fluxo sanguíneo regional; Fatores angiogênicos; Efeito antiangiogênese; Vasodilatação.

Summary

Ferreira-Santos L. *Influence of microRNAs on angiogenic and antiangiogenic factors in the pathway of vascular endothelial growth factor in coronary artery disease patients* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Endothelial dysfunction and inflammation are hallmarks of coronary artery disease (CAD). Some circulating microRNAs (miRNAs) expressed in the vascular endothelium and regulators of the angiogenesis pathway have been described in CAD. However, the local expression in skeletal muscle of these miRNAs is unknown in CAD patients, as well as the association of these miRNAs with peripheral blood flow and with angiogenic and antiangiogenic factors of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway in these patients. Therefore, the aims of this study were to evaluate the tissue and circulating miRNAs-126, -16, -21 and 92a expressions in CAD patients, the tissue gene and protein expression of the angiogenic and antiangiogenic factors of the VEGF pathway, to evaluate the peripheral blood flow (PBF), and to evaluate if the miRNAs expressions were associated with the PBF and with the protein expressions in these patients. **METHODS:** Twenty-two CAD patients without ventricular dysfunction (55 ± 1 years) and fourteen healthy control subjects (CS) were selected. A blood sample was collected to assess circulating miRNAs and the vastus lateralis biopsy was made to assess tissue miRNAs, genes and protein expressions. The miRNAs and genes were analyzed by RT-qPCR, proteins by western blotting, and peripheral blood flow by Doppler ultrasound (shear rate, SR) and venous occlusion plethysmography (muscle blood flow, MBF). Mean arterial pressure (MAP, oscillometric) and cardiac frequency (HR, electrocardiogram) were assessed. **RESULTS:** The tissue expressions of the miRNAs -126, -16 and -21 was reduced in the CAD group compared to the CS group, (72 ± 6 vs. 100 ± 10 , $p = 0.03$; 72 ± 5 vs. 100 ± 11 , $p = 0.03$; 66 ± 8 vs. 100 ± 11 , $p = 0.04$; respectively). The same behavior was observed for circulating miRNAs. The tissue and circulating expression of miRNA-92a was similar between groups. The gene expression of PI3KR2 was increased ($p = 0.02$), while iNOS ($p = 0.02$) and Bcl-2 ($p = 0.01$) were decreased in

CAD compared to the CS. The gene expression of the other evaluated factors was not different between groups. Regarding tissue protein expression, the factors Bad, Bcl-2 and VEGFR-2 were increased ($p < 0.05$), pERK1/2/ERK1/2 was decreased ($p = 0.047$) and p-Akt/Akt tended to be decreased ($p = 0.06$) in CAD patients. The other factors evaluated were similar between groups. At rest, the forearm and leg MBF, the forearm and leg vascular conductance (FVC and LVC, respectively), MAP and HR were not different between groups. However, during the handgrip and leg exercise, the CAD group had a lower FVC and LVC response compared to the CS group. The flow pattern, antegrade and medium shear rate (SR) of the brachial and femoral arteries were lower in the CAD group compared to the CS group. The retrograde and oscillatory SR were similar between groups. MiRNA-126 was associated with PI3KR2 protein expression and miRNA-16 with VEGFR-2. We did not observe associations between circulating miRNAs and brachial and femoral flow patterns. However, tissue miRNA-92a was associated with antegrade SR. Interestingly, circulating -126, -16 and -21 miRNAs were associated with FBF and FVC at rest and during exercise. On the other hand, in the leg exercise, we only observed an association between miRNA-16 and the FBF. **CONCLUSIONS:** Patients with CAD have reduced circulating and tissue miRNAs -126, -16, and -21 expressions. These angiomiRs involved in the VEGF pathway are altered in these patients, which could interfere in the expression of target genes, altering the process of angiogenesis, activation of the apoptotic pathway, and protein synthesis. In addition, a positive association was observed between c-miRNAs -126, -16 and -21 with FVC at rest and during exercise, thus suggesting the influence of these angiomiRs on the modulation of vascular function.

Descriptors: MicroRNAs; Coronary artery disease; Regional blood flow; Angiogenesis inducing agents; Angiogenesis inhibitors; Vasodilation.

Introdução

1-INTRODUÇÃO

Os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde mostram que as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) foram responsáveis por 40,5 milhões (71%), das 56,9 milhões de mortes no mundo todo¹. Só em 2016, mais de três quartos das mortes por DCNT (31,5 milhões) ocorreram em países de baixa e média renda, sendo que as mortes que aconteceram nesses países antes dos 70 anos de idade corresponderam a 46% do total de mortes. As principais causas de mortes por DCNT em 2016 foram por doenças cardiovasculares (DCV, 17,9 milhões), câncer (9,0 milhões), doenças respiratórias (3,8 milhões), incluindo asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, e ainda a diabetes que causou mais 1,6 milhões de mortes. Neste cenário, evidencia-se que a DCV é a primeira causa de morte dentre as DCNT¹. No Brasil, dados do Departamento de Análise de Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis, Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde mostram um quadro bem semelhante, sendo que, no ano de 2019 ocorreram 734.454 óbitos por DCNT, onde as doenças do aparelho circulatório foram responsáveis por 362.273 (49,3%) das mortes no país². Dentre as doenças do aparelho circulatório, a doença isquêmica do coração foi a primeira causa de óbitos com 116.766 mortes nesse ano², sendo que a doença arterial coronariana (DAC) aparece como a de maior prevalência no mundo e no Brasil.

Sabidamente, grande parte das morbidades associadas à DAC são causadas por comportamentos modificáveis, tais como, uso do tabaco, uso nocivo do álcool, dieta não saudável e inatividade física. Esses quatro comportamentos podem desencadear quatro alterações

metabólicas/fisiológicas principais como o aumento da pressão arterial, da glicemia, do colesterol e do sobrepeso/obesidade¹. Em conjunto, todas essas alterações contribuem para o surgimento da placa aterosclerótica, levando a modificações na estrutura e função das artérias coronarianas, desencadeando ações inflamatórias com liberação de citocinas, ocasionando a diminuição da oferta de oxigênio para o miocárdio.

Sabe-se que as células endoteliais (EC) e as células do músculo liso vascular (VSMC), componentes essenciais dos vasos sanguíneos, têm participação importante na ocorrência e no desenvolvimento da aterosclerose. Adicionalmente, macrófagos ativados pela cascata inflamatória terão papel central no início da aterosclerose, crescimento e ruptura de placas ateroscleróticas³⁻⁶

Sabe-se que a formação de placa aterosclerótica ocorre em mais de 90% dos casos diagnosticados de DAC, sendo a sua principal causa. Com isso, podemos dizer que a DAC é uma doença decorrente de um processo aterosclerótico inflamatório complexo, que envolve vários mecanismos, dentre eles, o aumento de estresse oxidativo e ativação plaquetária e trombótica que levam à disfunção endotelial^{6,7}.

A disfunção endotelial é caracterizada pelo desbalanço entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio devido, principalmente, à diminuição da produção e/ou da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO)^{6,8}, o que pode levar à diminuição da integridade vascular e alteração no processo de angiogênese. Assim, devido à disfunção endotelial, pacientes com DAC sofrem um processo de remodelamento vascular, rarefação capilar e conseqüentemente, redução do fluxo sanguíneo (Figura 1)

resultando em menor aporte de oxigênio para as áreas afetadas, o que pode provocar isquemia e agravamento do quadro clínico desses pacientes⁹, afetando não apenas o coração, mas também, a periferia.

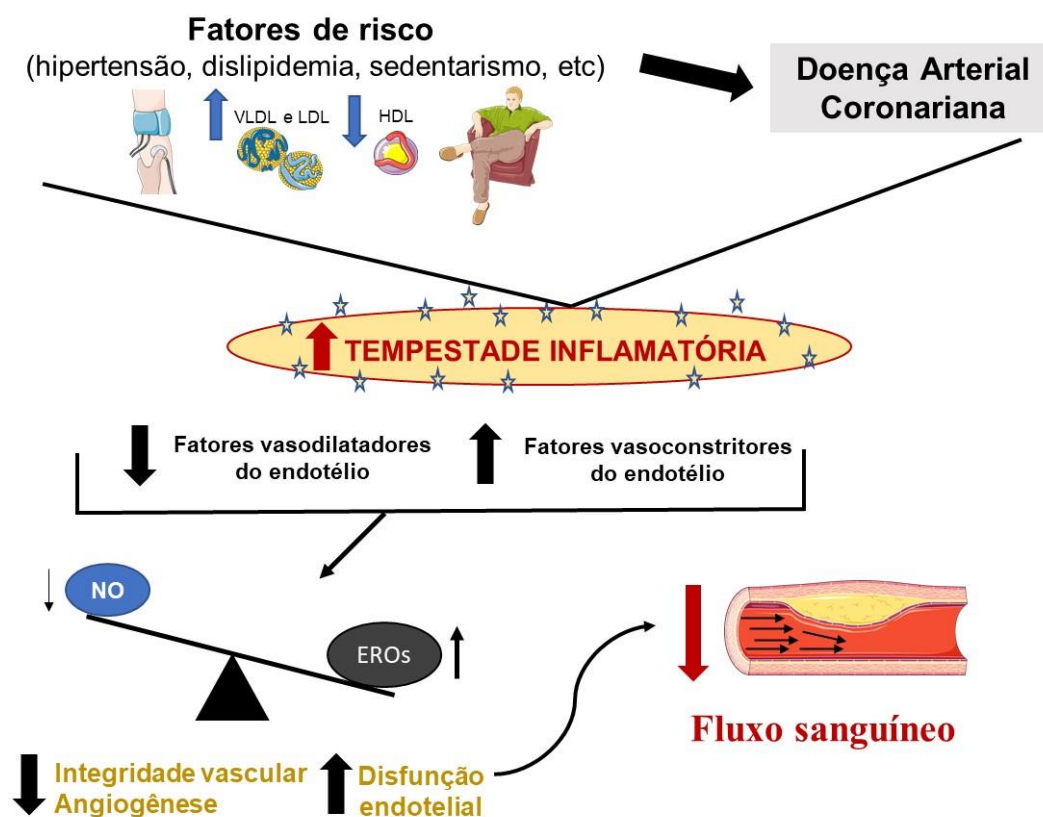


Figura 1. A doença arterial coronariana (DAC) associada à presença de fatores de risco, aumenta o estado inflamatório celular levando à diminuição da integridade vascular e da angiogênese e ao aumento da disfunção endotelial, o que irá impactar diretamente na redução do fluxo sanguíneo. VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; NO, óxido nítrico; EROs, espécies reativas de oxigênio. Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art¹⁰.

Interessantemente, o endotélio quando saudável apresenta equilíbrio na produção de fatores reguladores de vasoconstrição, vasodilatação e inflamação, com isto podendo limitar o desenvolvimento de aterosclerose, porém na presença de fatores de risco, o endotélio sofre disfunção, o que

altera sua capacidade de proteção, causando desregulação na liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores essenciais para a homeostase vascular¹¹⁻¹³. O endotélio vascular é responsável por integrar estímulos mecânicos e hormonais e assim iniciar uma cascata de sinalização com secreção de várias proteínas e moléculas mediadoras para que ocorra a regulação do vaso sanguíneo de acordo com a demanda¹³. Para isso, regula a permeabilidade de lipoproteínas do plasma, adesão de leucócitos, liberação de fatores antitrombóticos e pró-trombóticos, fatores de crescimento e substâncias vasoativas ou vasoconstritoras¹⁴. Assim, a presença de disfunção nas células endoteliais desempenha papel chave na fisiopatologia da doença aterosclerótica.

De fato, já está bem descrito na literatura que algumas patologias como a DAC, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a insuficiência cardíaca (IC) podem levar à diminuição tanto do fluxo coronariano¹⁵ quanto do fluxo muscular periférico em repouso¹⁶⁻¹⁸ e também durante manobras fisiológicas como o exercício^{17,18}.

A angiogênese é o processo de formação de novos capilares que ocorre por crescimento vascular por divisão (intussusceptiva), onde a parede do vaso se estende em direção ao lúmen ocorrendo a sua divisão em dois, ou por formação de novos capilares a partir dos capilares pré-existentes (brotamento)¹⁹. Este processo é regulado por uma complexa interação de fatores angiogênicos e antiangiogênicos sendo muito importante para o desenvolvimento e a homeostase dos tecidos.

Sabe-se que algumas condições fisiológicas podem atuar na manutenção da vasodilatação e angiogênese, tais como, *shear stress*, hipóxia,

aumento do fluxo sanguíneo, fatores de crescimento e hormônios que sinalizam para o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)^{19,20}. Nesse sentido, um mecanismo essencial na via intracelular angiogênica é a sinalização pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O VEGF é uma glicoproteína atuando, entre outras funções, na migração e proliferação das células endoteliais²¹ e, estimulando a produção de eNOS por meio do aumento da expressão gênica e proteica para o aumento do NO²². Este processo de aumento na biodisponibilidade do NO ocorre pela via de sinalização da PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) e da AKT (proteína quinase B, PKB)²³. O VEGF se liga, principalmente, aos receptores VEGFR-1 (Flt-1)²⁴ e VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR)²⁵. Estes receptores participam da via da angiogênese e manutenção da integridade vascular²⁵. O VEGFR-2 é o receptor que tem maior participação no processo de angiogênese, pois está envolvido no processo de diferenciação de células endoteliais²⁷ e sobrevivência celular²⁸. Assim, as principais funções dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 estão ligadas ao desenvolvimento do sistema vascular, o que tem sido documentado em estudos experimentais^{29,30}. De fato, estudo com camundongos em que o gene do receptor VEGFR-2 era silenciado, os pesquisadores observaram que o embrião morria no nono dia do seu desenvolvimento, o que foi atribuído à deficiência observada na vasculogênese e também à falta de formação da rede sanguínea nesses animais²⁹. Corroborando com esses resultados, estudo realizado por Fong et al.³⁰ com camundongos *knockouts* para o gene do receptor VEGFR-1 demonstrou que ocorria uma proliferação descontrolada com aumento no número de células progenitoras endoteliais, levando a uma desorganização vascular e morte do animal também no nono dia do estágio

embrionário. Esses resultados reforçam, portanto, a contribuição desses receptores na via de angiogênese.

Em pacientes com DAC, as concentrações de VEGF na circulação já foram mensuradas³¹. observaram que as concentrações plasmáticas de VEGF eram maiores nos pacientes com DAC em relação aos indivíduos saudáveis. Por outro lado, Ramos et al.³² observaram que pacientes submetidos à angioplastia com ou sem síndrome coronariana aguda apresentavam níveis mais baixos de VEGF que indivíduos sem história de DAC. Esses autores observaram, ainda, que a concentração de VEGF <40,8 pg/mL estava associada ao aumento do risco de eventos adversos principais como morte, eventos isquêmicos, reinternação e agravamento da DAC em um seguimento de 5 anos.

De fato, alguns autores reportaram não haver diferença^{33,34}, outros observaram aumento^{31,35,36} e outros autores observaram diminuição^{31,36} nas concentrações circulantes de VEGF em pacientes com DAC quando comparados aos indivíduos saudáveis ou sem DAC.

Assim, além da controvérsia exposta acima sobre os níveis de VEGF circulantes em pacientes com DAC, o fato principal de interesse do presente estudo é que as expressões dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do VEGF não têm sido documentadas em pacientes com DAC.

Adicionalmente, sabe-se que em condições fisiológicas, o processo de apoptose é um mecanismo importante por promover a homeostase do nosso organismo conduzindo as células a uma morte geneticamente programada, regulando o tamanho dos tecidos ao eliminar células defeituosas e descartáveis. Neste contexto, as proteínas da família Bcl-2 são de grande

interesse. A Bcl-2 (linfoma de células B2) é conhecida como proteína antiapoptótica, a qual protege as células contra a morte por apoptose³⁸. E, estudo realizado por Vander Heiden et al.³⁹ demonstrou que a expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a acidificação intracelular e, também, estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria³⁹. Já, a proteína Bad quando está no seu estado não-fosforilado se liga e forma um heterodímero com a proteína Bcl-2 inibindo-a, assim a Bad não-fosforilada tem papel pró-apoptótico. Além disso, a cascata de apoptose é desencadeada por Bax (proteína x associada a Bcl-2) por indução da liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, o qual é responsável por iniciar a cascata que levará a célula a sofrer o processo de morte⁴⁰. Entretanto, a Bad também tem papel antiapoptótico nesta cascata de sinalização para a morte celular. Isto é, quando a Bad é fosforilada pela Akt formando um heterodímero de proteínas Bad-14-3-3, a Bad deixa de se ligar ao Bcl-2, deixando está livre para desempenhar seu papel antiapoptótico ao inibir o processo desencadeado por Bax⁴⁰.

No entanto, esta morte celular programada também pode ser desencadeada por um estímulo patológico⁴¹. Na insuficiência cardíaca^{42,43} e hipertensão⁴⁴, o processo apoptótico ocorre com maior frequência, o que leva ao desequilíbrio entre a proliferação e morte celular, e ainda, a manutenção de um ambiente com rarefação microvascular. Com isso, pode ocorrer piora no estado inflamatório e disfunção endotelial com consequente redução do fluxo sanguíneo.

Interessantemente, também participando da regulação deste complexo sistema de sobrevivência celular e angiogênese, pequenos RNAs não

codificantes de proteínas, conhecidos como microRNAs (miRNAs) têm ganhado destaque nos últimos anos e vêm sendo amplamente estudados⁴⁵⁻⁴⁸. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes de proteínas, que agem como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais.^{45,49-51}

No núcleo da célula, os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II formando o transcrito primário pri-miRNA, que apresenta uma estrutura de dupla hélice do tipo *hairpin* (do inglês, grampo de cabelo) com aproximadamente 300 nucleotídeos, e com a presença de 7-metilguanosina (CAP) no terminal 5' e uma cauda de poliadenilados (A) no terminal 3'⁵². Este pri-miRNA é clivado no núcleo por um complexo microprocessador formado pela enzima ribonuclease III conhecida como Drosha e seu co-fator DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) produzindo um novo haipin de ~ 65 nucleotídeos. Com isso temos a formação do pre-miRNA (precursor do miRNA), sendo este exportado para o citoplasma através da exportina 5 e seu co-fator Ran-GTP. Já, no citoplasma, o pre-miRNA sofre uma nova clivagem através de uma segunda enzima ribonuclease III denominada Dicer, dando origem a uma pequena e imperfeita dupla fita de RNA (dsRNA) que contém tanto a fita do miRNA maduro quanto a fita anti-sense. Uma dessas fitas será incorporada pelo complexo RISC (*RNA-induced silence complex*) e a outra será descartada. O complexo RISC é responsável por controlar a expressão gênica, promovendo a degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) ou a repressão da tradução destes^{51,53} (Figura 2).

Os miRNAs se ligam ao RNA mensageiro (RNAm) alvo exercendo seus efeitos inibitórios e, portanto, reduzindo os níveis proteicos de seus genes-alvo⁵¹. Por possuir uma sequência muito pequena de nucleotídeos, um único miRNA é capaz de alvejar diversos mRNA⁵⁴. Em mamíferos, os miRNAs são expressos a partir de diversas regiões do genoma, estando presentes em regiões intergênicas, íntrons codificadores e em éxons de unidade transcricional codificadoras e não codificadoras⁵³.

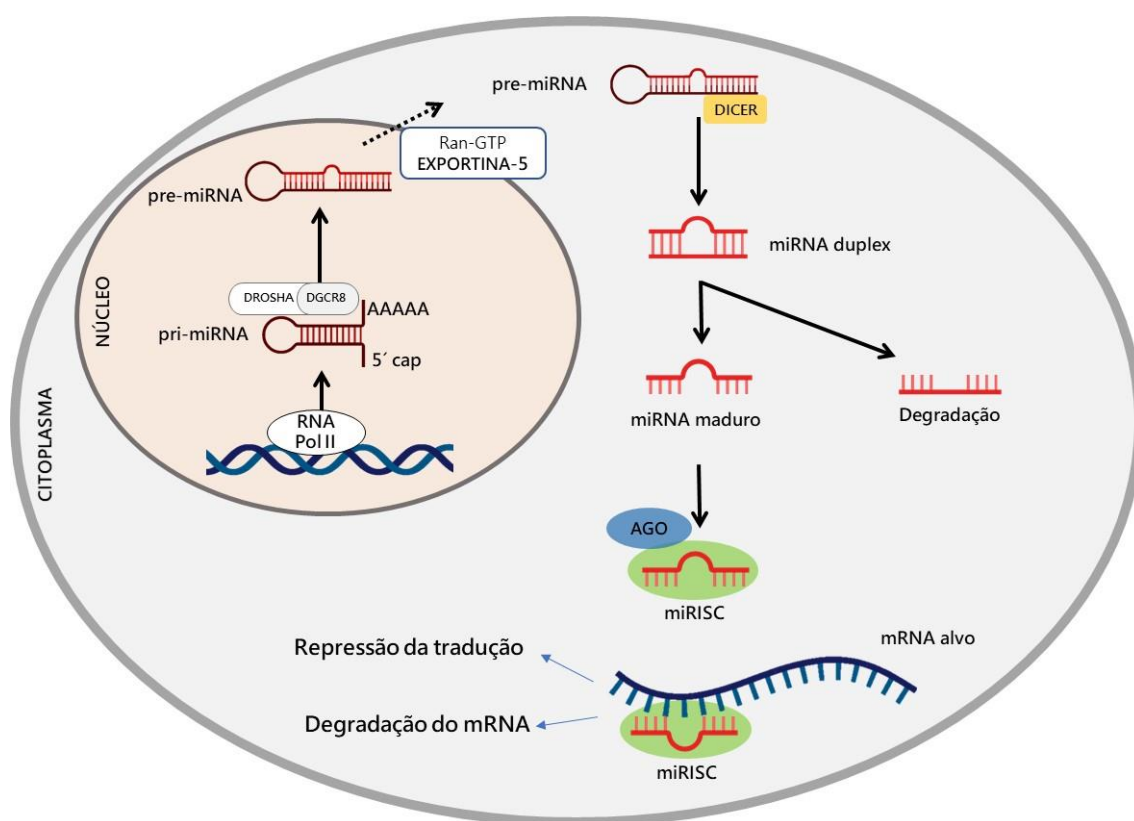


Figura 2. Biogênese do miRNA e seus mecanismos de ação no núcleo e citoplasma. Desenho criado com a ajuda do programa BioRender⁵⁵.

Os dados mais recentes publicados pelo miRBase (v22), base de dados onde são catalogados todos os miRNAs descobertos, mostram que a espécie humana contém 1.917 precursores em *hairpin* confirmados e 2.654 sequências

maduras de miRNAs catalogados⁵⁶. E, estudos de bioinformática demonstraram que um terço de todos os genes codificadores de proteína e as vias biológicas estão sob controle de miRNAs⁵⁷.

Alguns miRNAs foram descritos como reguladores de genes participantes da via do VEGF e angiogênese, tais como os miRNAs -126, -16, -21 e -92a.

Estudo realizado em humanos, demonstrou que a expressão do miRNA-126 circulante⁵⁸ e em células progenitoras endoteliais isoladas de células mononucleadas do sangue total⁵⁹ estava reduzida em pacientes com DAC. Contudo, alguns autores demonstraram que a expressão desse miRNA encontra-se reduzida somente em microvesículas circulantes, mas não no plasma destes pacientes⁶⁰. Na via do VEGF para angiogênese, o miRNA-126 tem dois alvos de interesse, o PI3KR2 (ou PIK3R2, ou p85- β , subunidade regulatória 2 da PI3K) e o Spred-1 (do inglês, *Sprouty related EVH1 domain containing 1*), sendo que, ambos regulam negativamente a cascata de sinalização do VEGF por alvejarem duas importantes vias neste processo de angiogênese, a via do PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato) e a via da Raf-1 (ou c-Raf, proteína treonina quinase), respectivamente^{47,48,59-64}. Portanto, o miRNA-126 teria um efeito pró-angiogênico, enquanto que o PI3KR2 e o Spred-1 seriam antiangiogênicos.

O miRNA-16 tem sido associado à regulação da angiogênese e da integridade vascular por alvejar diretamente o VEGF e a proteína Bcl-2, que tem papel antiapoptótico⁴⁵. Estudo realizado por Goretti et al.⁶⁵ demonstrou que o tratamento com anti-miRNA-16, o qual tem a função de silenciar o seu miRNA alvo, aumentava a expressão do VEGFR2 e das células progenitoras

endoteliais em indivíduos saudáveis, demonstrando-se, portanto, um efeito benéfico no silenciamento da atuação desse miRNA.

Além do miRNA-16, o miRNA-21 também parece ter papel importante na cascata de apoptose e sobrevivência celular^{45,66}. De acordo com o programa *TargetScanHuman* (Release 7.2) o gene Bcl-2 é alvo validado para os miRNAs -16 e -21 e o gene PTEN para o miRNA-21. Estudos utilizando o modelo de *knockdown* para o miRNA-21 demonstraram um aumento do PTEN (homólogo de fosfatase e tensina) em VSMCs⁷⁰ e diminuição do fator de sobrevivência celular Bcl-2 tanto em VSMCs⁷⁰ quanto em células de glioma U78MG⁶⁹.

Estudo conduzido por Han et al.⁷¹ demonstrou que a expressão do miRNA-21 circulante estava aumentada em pacientes com DAC. E, os autores sugerem que este miRNA pode ser utilizado como um marcador de desenvolvimento e progressão da doença.

Ademais, os miRNAs -92a e -21 têm participação na regulação da expressão da eNOS via *shear stress* e no desenvolvimento da aterogênese dependente de diferentes padrões de fluxo sanguíneo no vaso⁷²⁻⁷⁵. Zhou et al.⁷⁶ expuseram células endoteliais da veia umbilical de humanos (HUVECs) ao *shear stress* oscilatório e observaram que a expressão do miRNA-21 aumentava, o qual foi associado como mediador do fenótipo pró-inflamatório dessas células. Em outro experimento com células, Wu et al.⁷⁴ observaram que o aumento da expressão do miRNA-92a por estímulo de fluxo oscilatório reduzia a expressão de eNOS via fator de transcrição KLF (em inglês, *Krüppel-like factor*) em HUVECs e, quando essas células foram tratadas com anti-miR-92a, a expressão da eNOS foi reestabelecida. Ainda, esses autores observaram que um fluxo laminar foi capaz de reduzir a expressão do miRNA-

92a⁷⁴. Em pacientes com DAC, estudo realizado por Liu et al.⁷⁷ demonstrou que a expressão de miRNA-92a circulante medido no plasma era significativamente menor quando comparado com indivíduos saudáveis. Contrariamente, Niculescu et al.⁷⁸ observaram que os níveis circulantes de miRNA-92a estavam aumentados no soro de pacientes com DAC quando comparado ao grupo controle saudável. Estes achados reforçam a ideia de que os níveis de miRNA irão sofrer variações dependendo do local em que o miRNA for quantificado. Na Figura 3 podemos observar os genes-alvo dos miRNAs -126, -16, -21 e 92a na via do VEGF.

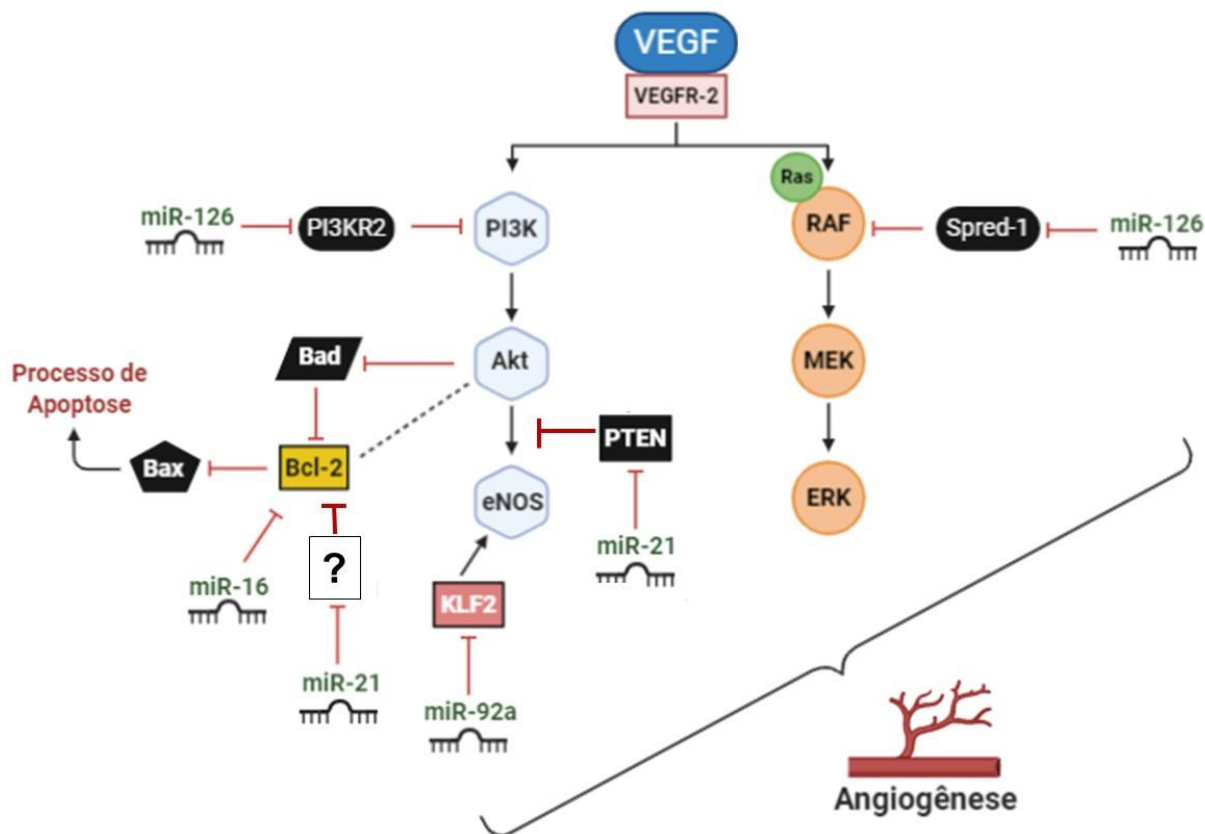


Figura 3. Esquema representativo dos miRNAs e seus alvos de interesse na via do VEGF. Regulação da angiogênese por diferentes vias de sinalização PI3K/Akt/eNOS e RAF/MEK/ERK. O miRNA-126 regula diretamente PI3KR2 e Spred-1, o miRNA-16 regula diretamente VEGF, VEGFR2 e Bcl-2, o miRNA-21 regula indiretamente Bcl-2 e eNOS, e o miRNA-92a regula indiretamente a eNOS. PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato; Akt, proteína quinase B; eNOS, enzima óxido nítrico sintase endotelial; Raf-1, proteína treonina quinase; ERK, quinase de regulação de sinal extracelular; MEK, quinase com dupla especificidade; PI3KR2, subunidade regulatória dois da PI3K; Spred-1, proteína relacionada a brotamento; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR2, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular; Bcl-2, linfoma de células B2; KLF2, fator 2 do tipo Krüppel; PTEN, homólogo de fosfatase e tensina. Os fatores destacados em preto fazem parte da regulação antiangiogênica da via, enquanto que os demais fatores apresentados são angiogênicos. Desenho criado com a ajuda do programa BioRender⁵⁵.

Apesar de estudos terem sido realizados avaliando a expressão desses miRNAs circulantes em indivíduos saudáveis e em pacientes com DAC, não está claro na literatura, a influência desses miRNAs nos fatores angiogênicos e

antiangiogênicos da via do VEGF em pacientes com DAC. Além disso, o estudo da expressão local (tecidual) desses miRNAs e dos fatores envolvidos nessa via de angiogênese diretamente na musculatura esquelética ainda não foi estudada nesses pacientes.

Sabe-se que a angiogênese pode estar associada a uma maior capilarização do músculo esquelético, e o contrário, a presença de rarefação capilar pode agravar o processo de angiogênese com a ativação de vias apoptóticas e a redução da síntese proteica⁷⁹. Interessantemente, a angiogênese no músculo esquelético é bloqueada pela inibição da eNOS⁸⁰, confirmando que o NO é um importante fator para a angiogênese⁸¹. Por sua vez, o fluxo sanguíneo vascular é determinado em grande parte pela liberação dos fatores vasodilatadores dependentes do endotélio, como o NO. Nesse contexto, sabemos que, de fato, pacientes com DCV apresentam menor fluxo sanguíneo periférico em repouso e durante manobras fisiológicas quando comparados à indivíduos saudáveis^{17,18}.

De grande impacto clínico, tem sido demonstrado que o fluxo sanguíneo muscular diminuído em pacientes com insuficiência cardíaca é um fator prognóstico importante na DCV⁸². Assim, é possível especular que uma alterada expressão dos miRNAs envolvidos na via de angiogênese do VEGF poderia também influenciar o fluxo sanguíneo periférico nos pacientes com DAC. Este aspecto não foi documentado na literatura e é um objetivo de interesse no presente estudo na avaliação de pacientes com DAC.

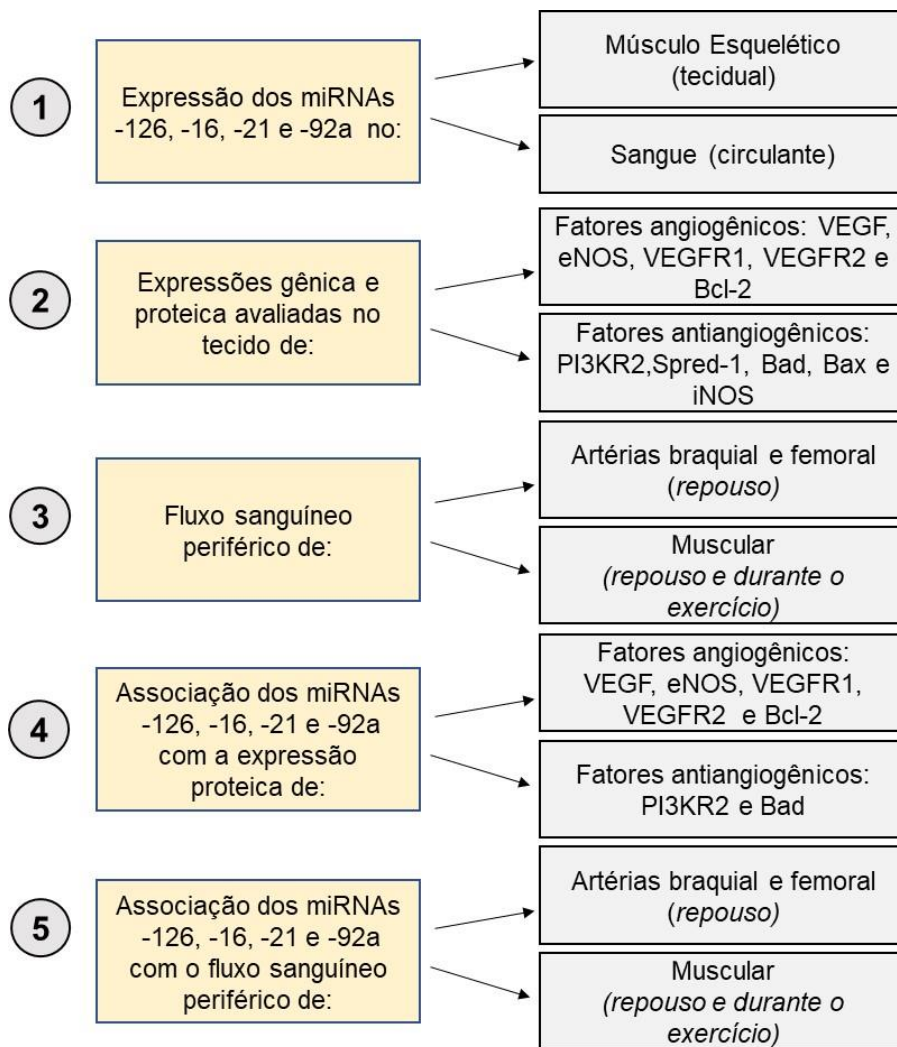
Diante do exposto, o estudo desses miRNAs na circulação e também localmente, na musculatura esquelética, e a associação dessa expressão com o fluxo sanguíneo periférico e com os fatores angiogênicos e antiangiogênicos

contribuirá ainda mais para a compreensão da sua funcionalidade em pacientes com DAC.

Objetivos

2-OBJETIVOS

Em pacientes com DAC, avaliar:



Hipóteses

3-HIPÓTESES

- 1- Pacientes com DAC apresentarão níveis de miRNA-126 diminuídos e níveis dos miRNAs -16, -21 e -92a aumentados em comparação com o grupo Controle Saudável.
- 2- Pacientes com DAC apresentarão expressão dos fatores angiogênicos VEGF-A, Bcl-2, eNOS, VEGFR-1 e VEGFR-2 diminuídos e expressão dos fatores antiangiogênicos PI3KR2, Spred-1, iNOS e Bad aumentados quando comparados com o grupo Controle Saudável.
- 3- Pacientes com DAC terão menor fluxo sanguíneo periférico em repouso e durante o exercício quando comparado com o grupo Controle Saudável.
- 4- Os miRNAs -126, -16, -21 e -92a estarão associados aos fatores angiogênicos e antiangiogênicos na via do VEGF influenciando as suas expressões.
- 5- Os miRNAs -126, -16, -21 e -92a circulantes e teciduais estarão associados ao fluxo sanguíneo periférico modulando sua resposta.

4-MÉTODOS E MATERIAIS

4.1 Desenho do estudo

Este é um estudo observacional analítico transversal onde foram estudados voluntários triados no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) ou da comunidade. Foram incluídos pacientes com diagnóstico prévio de DAC em acompanhamento no ambulatório de Coronariopatia Crônica no InCor HCFMUSP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e convocados a partir de lista de pacientes envolvidos em protocolos anteriores finalizados na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor HCFMUSP, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo. Para efeito de comparação das variáveis estudadas incluímos um grupo controle de indivíduos saudáveis (CS) triados no ambulatório de Cardiologia do Exercício do InCor HCFMUSP e provenientes da comunidade, pareados pela idade, peso, estatura e índice de massa corporal ao grupo de pacientes com DAC. O grupo CS não apresentavam doença cardiovascular documentada e nem fatores de risco para doença cardiovascular no momento de entrada no estudo, avaliados a partir dos exames de triagem, hemograma, RX e ECG de repouso.

Dentre os pacientes com DAC crônica foram selecionados aqueles clinicamente estáveis, com a função ventricular esquerda preservada, sendo ainda a DAC comprovada por exame diagnóstico de imagem.

O cálculo amostral foi baseado em um “Power” de 90%, com índice alfa de 0,05 para detectar diferenças na expressão dos miRNAs-126, -16, -21 e -92a. Assim, para o cálculo do tamanho da amostra foram consideradas as médias e o desvio-padrão da expressão desses miRNAs com base nos estudos realizado por Fichtlscherer et al.⁵⁸ com pacientes com DAC. Desta forma, foi considerado o maior valor amostral previsto (N=15) e considerando possíveis perdas no estudo incluímos um total mínimo de 20 pacientes com DAC.

O presente estudo foi aprovado na Comissão Científica e de Ética do InCor sob o número SDC 3999/13/124 e Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP - CAPPesq sob o número CAAE: 24057913.2.0000.0068.

4.2 Critérios de inclusão

- Diagnóstico clínico de DAC crônica estável;
- Idade entre 30 a 65 anos, de ambos os sexos;
- $IMC \leq 30 \text{ kg/m}^2$;
- Não serem praticantes de atividade física regular, no mínimo 3 meses antes da pesquisa.

4.3 Critérios de exclusão

- Pacientes com neuropatia diabética e/ou isquemia em membros inferiores;
- Diagnóstico prévio de doenças pulmonares crônicas, neurológicas com sequela ou não, ortopédicas, neoplásicas, insuficiência renal e diabetes mellitus insulínica dependente;
- Pacientes acometidos de infarto agudo do miocárdio, cirurgia cardíaca ou internação hospitalar de origem cardíaca seis meses antes da entrada no estudo e portadores de marcapasso/cardiodesfibrilador implantável;
- Pacientes com Fração de ejeção do ventrículo esquerdo < 45%;
- Tabagismo atual e gestantes.

4.4 Avaliação clínica inicial

Os voluntários foram triados por avaliação clínica pelo médico cardiologista para identificar as condições de saúde e se o mesmo preenchia os critérios de inclusão no projeto. Nesta etapa inicial de avaliação foram realizados os seguintes exames: hemograma completo, ECG de repouso e raio-X de tórax. A partir da avaliação clínica médica foram registrados os medicamentos em uso pelos pacientes.

4.5 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial (PA) foi medida em repouso e durante os protocolos de exercício de preensão de mão e exercício de perna, a cada minuto, pelo método oscilométrico indireto (DIXTAL, modelo DX 2022, a Figura 4 ilustra a

medida feita no braço). A frequência cardíaca (FC) foi medida pelo eletrocardiograma (*D. E. Hokanson, Inc., Bellevue, WA, EUA*) com 3 eletrodos nas posições, braço direito, braço esquerdo e perna esquerda, para registro da derivação MC5.



Figura 4. Avaliação da pressão arterial pelo método oscilométrico indireto a cada minuto (DIXTAL, modelo DX 2022).

4.6 Avaliação da Função Cardíaca

Os pacientes foram submetidos ao estudo ecocardiográfico unidimensional (modo-M), bidimensional (modo-B), e tecidual (tridimensional) com o objetivo de avaliar a função ventricular dos participantes. As imagens obtidas foram associadas ao *Doppler* pulsado, contínuo e a cores. As imagens ecocardiográficas foram adquiridas através de um aparelho de ultrassom cardíaco tipo VIVAD E9 (*General Eletrics – GE*). A documentação dos exames foi gravada em disco vídeo digital (DVD-R), possibilitando análises futuras das imagens gravadas. Foram avaliados os seguintes índices ecocardiográficos: função ventricular esquerda, sistólica e diastólica, volumes e tamanho de cavidades atriais e ventriculares, espessura de paredes atriais e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (método de Simpson) por imagens bidimensionais. Os índices de relaxamento e contração ventriculares, direito e

esquerdo e movimentos dos seguimentos cardíacos foram avaliados pelo Eco tecidual (tridimensional). Foi avaliada também a massa do VE, estimada através do modo-M com corte transversal a nível de músculos papilares pela medida de suas dimensões e espessura das paredes. Foi utilizado o *Doppler* colorido, no plano longitudinal do VE para avaliar o jato de fluxo, entre as valvas cardíacas para quantificação de possíveis disfunções valvares (insuficiências e/ou estenoses)⁸³.

4.7 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Periférico

4.7.1 Fluxo braquial e femoral

O diâmetro e velocidade de passagem de sangue das artérias braquial e femoral foram avaliados através da técnica de ultrassonografia vascular com doppler (Figura 5). Esta avaliação foi realizada com os pacientes na posição supina. As imagens de diâmetro e velocidade de passagem do sangue foram avaliadas no modo duplex, via transdutor linear multifrequencial operando a uma frequência de 6 a 12 MHz. Este transdutor foi conectado ao equipamento de ultrassom de alta resolução (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway). Um sistema de ECG de três derivações acoplado a este equipamento foi utilizado para obter as fases do ciclo cardíaco. As imagens de velocidade foram obtidas com um ângulo de insonação igual a 60° e volume de amostra localizado no centro do vaso. As imagens foram analisadas pelo software Cardiovascular Suite (Quipu, Itália). Para o cálculo dos valores de *shear rate* (SR) foram utilizadas a velocidade média (cm/s) e o diâmetro (cm) das artérias. Posteriormente, foram utilizadas nas fórmulas a seguir; Anterógrado: $SR_a = 4(V_{\text{anterógrado Média}}/\text{Diâmetro artéria})$, Retrógrado: $SR_r = 4(V_{\text{retrógrado Média}}/\text{Diâmetro}$

artéria) e para o cálculo do *Shear Rate* oscilatório foi utilizada a fórmula $SR_o = SR_r / (SR_a + SR_r)^{84}$.

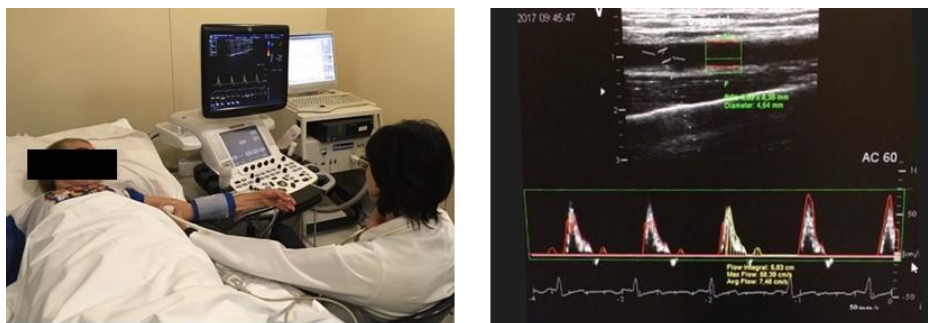


Figura 5. Exame com Doppler da artéria braquial (à esquerda). Imagem representativa de um vaso e medida do fluxo anterógrado (à direita)

4.7.2 Fluxo sanguíneo muscular (FSM)

O FSM foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa (AI6; *Arterial Inflow System*; D. E. Hokanson, Inc., Bellevue, WA, EUA, Figura 6C).

Fluxo sanguíneo muscular no antebraço

O braço contralateral não-dominante foi elevado acima do nível do coração para garantir uma adequada drenagem venosa (Figura 6A). Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo é colocado ao redor do antebraço, a 5 cm de distância da articulação úmero-radial. São posicionados 2 manguitos: um manguito no punho, que é inflado a um nível supra-sistólico, sempre 30 segundos antes do início das medidas, sendo que este se mantém inflado por todo período do protocolo, e outro manguito no braço, que é inflado acima da

pressão venosa a cada 10 seg. O aumento em tensão no tubo silástico reflete o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação. A partir dos dados de fluxo foram calculadas a condutância vascular do antebraço e da perna (CVA e CVP). A CVA e CVP foram calculadas pela divisão do FSM (ml/min/100ml) pela PAM (mmHg) e multiplicado por 100^{85,86}.

Fluxo sanguíneo muscular na perna

Os mesmos procedimentos da medida do fluxo sanguíneo muscular no antebraço foram realizados para a medida do fluxo sanguíneo muscular na perna. Porém, na perna o tubo silástico preenchido com mercúrio é colocado na circunferência mais larga da região da panturrilha e os 2 manguitos foram posicionados na coxa e no tornozelo do participante (Figura 6B).

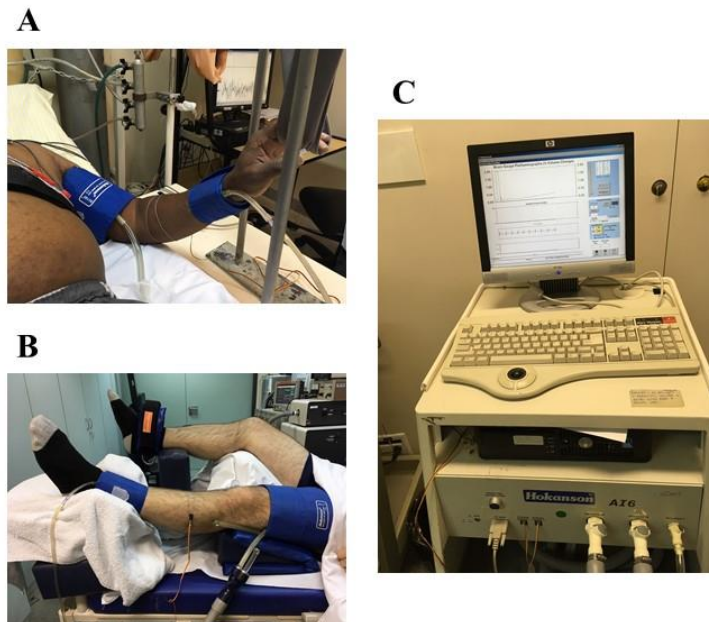


Figura 6. Avaliação do fluxo sanguíneo muscular por pletismografia de oclusão venosa. A) Fluxo sanguíneo medido no antebraço. B) Fluxo sanguíneo medido na panturrilha. C) Equipamento utilizado para a medida do fluxo (AI6; Hokanson, WA, EUA).

4.8 Avaliação dos miRNAs circulantes (coleta e extração)

Para a avaliação dos miRNAs circulantes foi realizada a punção venosa braquial para a coleta de sangue periférico em tubo especial (*PAXgene Blood RNA Tube, PreAnalytiX. Hombrechtikon, Switzerland*) com capacidade de 2,5 mL de sangue total. Cada tubo PAXgene contém uma solução que estabiliza e purifica o RNA total, estabilizando também os miRNAs intracelulares. Esta solução é capaz de inibir os processos de degradação do RNA protegendo o conteúdo por um período de até 50 meses sem alterações significativas na integridade do miRNA após armazenado em freezer -80°C.

O sangue coletado neste tubo especial ficou 24h em temperatura ambiente, sendo no dia seguinte armazenado em freezer -20°C por até 72h e posteriormente, armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.

As análises dos miRNAs circulantes foram realizadas através de um kit apropriado (*PAXgene Blood miRNA Kit, PreAnalytiX. Hombrechtikon, Switzerland*), que purificou o RNA intracelular, incluindo o miRNA. A purificação é realizada usando tecnologia de purificação de RNA à base de sílica em formato de coluna de rotação. A purificação foi realizada manualmente usando uma microcentrífuga. O kit forneceu uma solução pré-analítica completa para coleta e estabilização através da purificação de RNA total de alta qualidade, conforme descrito previamente⁸⁷.

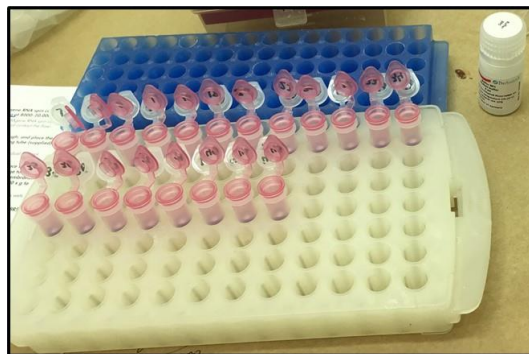


Figura 7. Análise dos miRNAs circulantes através do *PAXgene Blood miRNA Kit*. O RNA foi purificado utilizando uma tecnologia à base de sílica em formato de coluna de rotação.

4.9 Avaliação dos miRNAs teciduais e da expressão dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos

Com o intuito de quantificar os miRNAs teciduais, na musculatura esquelética, e a expressão dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos foi realizada a biópsia do músculo esquelético para retirada de pequeno fragmento do músculo vasto lateral. A partir desta coleta, a amostra de músculo foi armazenada em freezer com temperatura de -80°C . Posteriormente, foi realizada a extração do RNA total e quantificação utilizando-se as técnicas de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*Real Time RT-PCR*) para análise das expressões dos miRNAs e genes (mRNA) e a técnica de *western blotting* para quantificar as proteínas. A seguir os métodos serão detalhados.

4.9.1 Biópsia do Músculo Esquelético

A biópsia muscular foi feita no músculo vasto lateral, aproximadamente no ponto médio entre a borda superior da patela e o trocânter, ou na área de maior secção transversal do músculo, conforme procedimentos pré-estabelecidos do laboratório⁸⁸. Após assepsia com clorexidina foi feita anestesia local com Lidocaína 1%. Em seguida, foi feita uma pequena incisão na pele e subcutâneo de mais ou menos meio centímetro de comprimento e 1 cm de profundidade. Neste momento, o sangramento local foi estancado por compressão. Através da incisão foi introduzida uma agulha de Allendale (Bergstron modificada) até uma profundidade suficiente para ultrapassar a fáscia e penetrar no músculo. Por meio de uma pressão negativa feita por uma seringa acoplada à agulha, retirou-se um pequeno fragmento do músculo vasto-lateral. Após a retirada da agulha, foi feita uma nova compressão local para estancar o sangramento. Em seguida, é dado o “ponto falso” com fita apropriada (*Steri-Strip*) no local da incisão. Por último, a coxa foi enfaixada com gaze estéril e atadura aplicando-se compressão moderada por um período de seis a oito horas. As amostras de tecido muscular foram imediatamente lavadas com solução salina pré-resfriada e dissecadas, a fim de se retirar todo o tecido conjuntivo e adiposo. A amostra de tecido crio-protegida foi posteriormente estocada a -80°C até ser analisada. Todo o procedimento foi realizado na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício - InCor/HC-FMUSP por médico especializado na realização dessa técnica (Figura 8).



Figura 8. Biópsia do músculo vasto-lateral. A) Após a anestesia local, a agulha foi posicionada no local da incisão. B) Preparação para a retirada do fragmento muscular com a ajuda de seringa para sugar o músculo para dentro da agulha e permitir pequeno corte. C) Separação do músculo para posterior armazenamento no freezer -80°C.

4.9.2 Expressão de miRNAs e genes (mRNAs)

Foram analisadas as expressões de miRNAs e mRNAs de fatores relacionados ao crescimento e sobrevivência endotelial na musculatura esquelética. A expressão dos genes VEGF, eNOS, PI3KR2, Spred1, Bcl-2, VEGFR1, VEGFR2, iNOS, Bad, Bax e HIF-1A, e dos miRNAs -126, -16, -21 e -92a foram realizados pela técnica de análise quantitativa da transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time RT-qPCR*) conforme descrito abaixo.

- Extração do RNA total

Todo o procedimento foi realizado com a utilização de luvas, materiais e soluções autoclavados reservados para RNA. Amostras de biópsia do vasto lateral foram mantidas em nitrogênio líquido previamente a extração. As amostras com ~ 50 mg foram homogeneizadas em *TRIzol® Reagent* (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA). A extração foi realizada conforme as instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar

resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA, Figura 9) no comprimento de onda de 260nm. A integridade da amostra foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídeo (Figura 10). O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 40 minutos. A qualidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S, onde a relação 28S/18S deverá ser aproximadamente 2. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas⁸⁹.

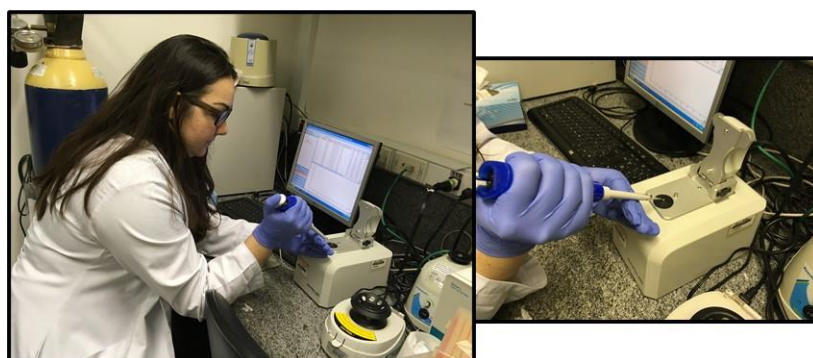


Figura 9. Técnica de verificação da concentração total de RNA através do espectrofotômetro NanoDrop.

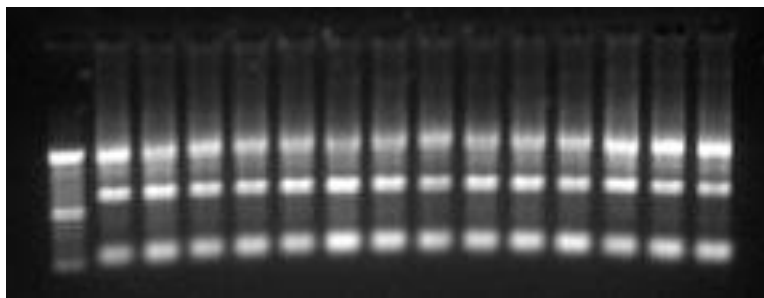


Figura 10. Técnica de verificação da integridade das amostras realizada por eletroforese em gel de agarose 1%.

- Síntese de cDNA

Os cDNAs para análise de mRNAs foram sintetizados a partir de 2 μ g de RNA total extraídos do tecido. As amostras foram incubadas com 0,5 μ g/mL de oligo dT (12-18pb) a 65°C por 5 minutos para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 μ L contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Life Technologies, CA, EUA). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação.

O cDNA para a análise de cada miRNA foi sintetizado a partir de RNA total utilizando *primers* gene-específicos de acordo com o protocolo do ensaio *microRNA TaqMan* (Applied Biosystems, CA, EUA). Os 15 μ L de reação obtidos pelo protocolo do Kit de Transcrição Reversa para *microRNA TaqMan* (Applied Biosystems, CA, EUA) foram incubados em termociclador por 30 min a 16°C,

30 min a 42°C, 5 min a 85°C e depois mantido a 4°C. Ambos cDNAs obtidos foram estocados no freezer a -20°C até a realização da reação de RT-PCR⁸⁹.

- Reação em cadeia da polimerase em tempo-real (RT-PCR)

O PCR em tempo real foi realizado pelo sistema da detecção do produto específico amplificado no equipamento ABI 7500 (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green I. A otimização da reação do PCR em tempo real foi realizada conforme as instruções do fabricante (Applied-Biosystems, protocolo SYBR-Green I), corrigido para volume final de 20 µl por reação. O PCR foi padrão (protocolo do kit SYBR-Green I master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems), conforme descrito previamente⁸⁹. Depois da otimização, os primers foram utilizados na concentração de 200 nM para a detecção e a quantificação relativa da expressão dos genes da ciclofilina (gene controle-interno), VEGF, eNOS, PI3KR2, Spred1, Bcl-2, VEGFR1, VEGFR2, iNOS, Bad, Bax e HIF-1A. Os primers utilizados no PCR em tempo real estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados no PCR em tempo real para os genes.

Gene	Sequência
CICLOFILINA	F 5' AGCAGTGCTTGCTGTTCCCTTA 3' R 5' TCTGTGAAAGCAGGAACCCTT 3'
VEGF-A	F 5' TCTCTCTCTCCCAGATCGGTGACAGTCAC 3' R 5' TCAAAGGAATGTGTGGTGGGGACAGG 3'
eNOS	F 5' CGGGATCAGCAACGCTACCACGAG 3' R 5' CTGTCGCTCCTGCAAAGAAAACTCTGG 3'
PI3KR2	F 5' ACTCACCTTCTGCTCCGTTG 3' R 5' ACTCGTGGCGGTAGTGATTG 3'
Spred-1	F 5' CGTGTGACACTAGCGATGACAAGTTCTGC 3' R 5' CGATGGCACATTCTCAAAGGGACGTAG 3'
Bcl-2	F 5' GCGGCCTCTGTTTGATTTCT 3' R 5' TTCGGCGTGGAAATCTCAGT 3'
VEGFR-1	F 5' CCTGCAAGATTCAGGCACCTAT 3' R 5' CTTTTTGTTGCAGTGCTCACCT 3'
VEGFR-2	F 5' ATGCATCCTTGCAGGACCAA 3' R 5' GGTTTCCTGTGATCGTGGGT 3'
iNOS	F 5' ATCTGCAGACACGTGCGTTA 3' R 5' CGGATGAGCTGAGCATTCCA 3'
Bad	F 5' CAGACCCGGCAGACAGATGAG 3' R 5' AGATGTTACGTAGTCAAGGCACA 3'
Bax	F 5' GCCCTTTTGCTTCAGGGTTTC 3' R 5' ACAGGGACATCAGTCGCTT 3'

A fim de detectar com precisão os miRNAs maduros foi realizada a quantificação dos miRNAs utilizando o protocolo de ensaio miRNA TaqMan (Applied Biosystems, CA, EUA). A reação de PCR contendo 20uL incluiu 1,33uL

do produto de RT, 10ul de TaqMan Universal PCR máster mix II (2×), 7,67ul de água livre de nuclease e 1ul da mistura de primers e sondas do protocolo do ensaio TaqMan da Thermo Fisher Scientific, número de catálogo #4427975, miRNA-126-3p (ID 002228), miRNA-16-5p (ID 000391), miRNA-21-5p (ID 000397), miRNA-92a-3p (ID 000431), miRNA-186-5p (ID 002285) e U6 (ID 001973).

As reações foram incubadas em uma placa de 96 poços óptica a 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15s e 60° durante 1 min. As amostras foram normalizadas pela expressão do controle endógeno U6 para os miRNAs teciduais e miRNA-186-5p para os miRNAs circulantes.

O produto da geração do PCR foi monitorizado por medição do aumento da fluorescência provocada pela ligação de *SYBR green* na cadeia dupla de DNA ou pela presença da sonda no ensaio *miRNA TaqMan* em cada fase de anelamento. A curva de dissociação observada na análise de *SYBR green* foi gerada no final da reação para verificar se um único produto foi amplificado. Cada amostra foi analisada em triplicata. Quantidades relativas de expressão do gene alvo foram comparadas após a normalização dos valores de controle endógeno (ΔCT)⁸⁹. Mudanças em vezes na expressão dos mRNAs e miRNAs foram calculados utilizando as diferenças em valores dos ΔCT entre os grupos ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Figura 11).

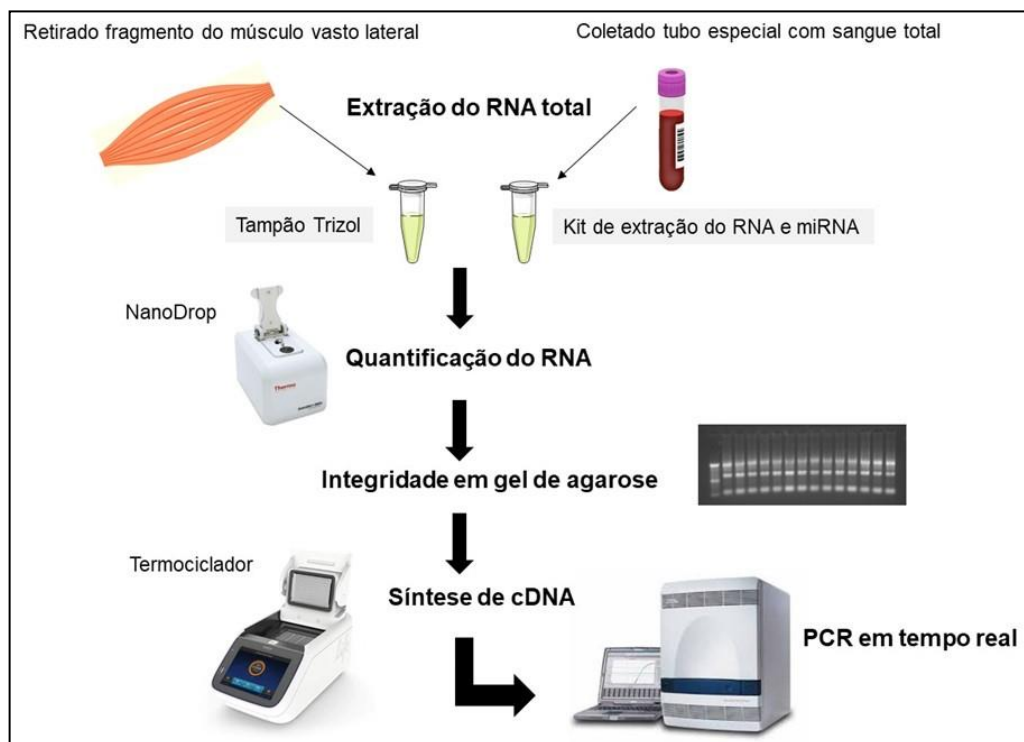


Figura 11. Processo de quantificação de miRNAs e genes (mRNA) do músculo vasto lateral e miRNAs do sangue total utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art¹⁰.

4.9.3 Expressão de proteínas (Western Blotting)

Para a expressão proteica, as amostras foram coletadas e armazenadas em freezer a -80°C . Após descongeladas, as amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA contendo Tris-Base 50mN, NaCl 150mN, Triton 1%, SDS 0,1%. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford sendo utilizado o equipamento para leitura de microplaca. Posteriormente, as amostras foram preparadas e submetidas a corrida com a técnica de eletroforese (equipamento *Bio-Rad*) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 6 a 15%) por aproximadamente 1h40min, com variações de 80 a 120 volts. Após a corrida foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de

nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletroforese da *Bio-Rad* por 1h15min, a 100 volts. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução Ponceau para a verificação da efetividade da transferência. Após confirmação da presença das bandas na membrana de nitrocelulose, estas foram bloqueadas em uma solução com BSA 5% e solução TBS-Tween por 1-2h em temperatura ambiente. Posteriormente foram incubadas a 4°C *overnight* com o anticorpo primário específico para cada proteína estudada. A ligação do anticorpo primário foi detectada com a utilização de anticorpo secundário. A expressão de β -actina, controle endógeno, foi utilizada para normalizar os resultados. Através de reação de quimiluminescência (ECL) as bandas foram quantificadas usando o *Image Lab™ Software (Version 5.1, Bio Rad Laboratories Inc.)* (Figura 12).

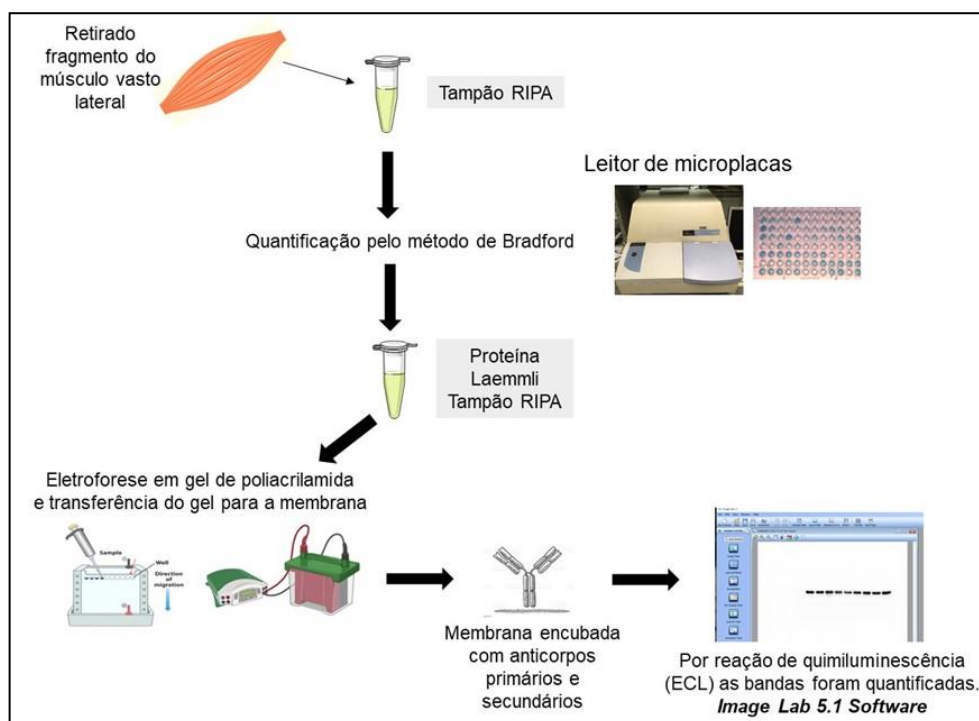
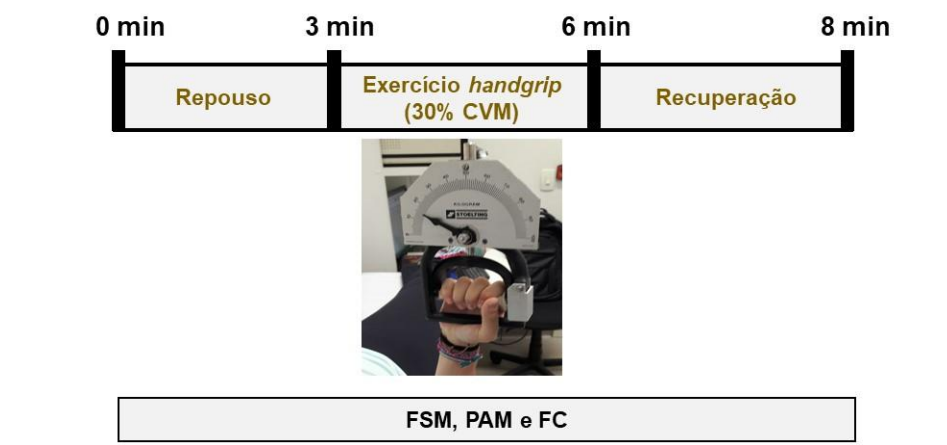


Figura 12. Processo de quantificação das proteínas do músculo vasto lateral utilizando a técnica de *western blotting*. Desenho criado com a ajuda do programa Smart Servier Medical Art¹⁰.

4.10 Protocolos experimentais com exercício isométrico

No *protocolo experimental 1* foi realizado o exercício isométrico de preensão de mão (*handgrip*, Dinamômetro, Sanny) utilizando-se um dinamômetro e no *protocolo experimental 2* foi realizado exercício isométrico de perna utilizando-se também um dinamômetro (Dinamômetro Kratos modelo DLC). Ambos os protocolos foram realizados a 30% da contração voluntária máxima (CVM) previamente avaliada. A pressão arterial, frequência cardíaca e o fluxo sanguíneo muscular do braço (*protocolo experimental 1*) e da perna (*protocolo experimental 2*) foram registrados. Os protocolos experimentais 1 e 2 foram realizados em duas sessões distintas, de forma randomizada, com pelo menos 48h de intervalo entre elas (Figura 13).

Protocolo Experimental 1 – Exercício de preensão de mão (*handgrip*)



Protocolo Experimental 2 – Exercício de perna

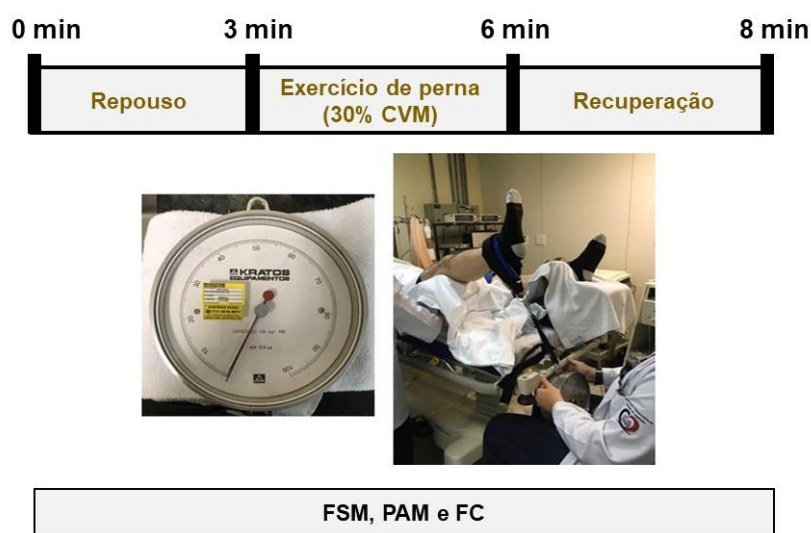


Figura 13. Sequências dos protocolos experimentais 1 e 2. CVM, contração voluntária máxima; FSM, fluxo sanguíneo muscular; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

4.11 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro-padrão da média. Foram testadas a normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk* e a homogeneidade pelo teste de *Levene* para todas as variáveis. O teste χ^2 (*Qui-quadrado*) foi utilizado para avaliar a diferença nas proporções de sexo entre os grupos DAC

e CS. Os testes t de “*Student*” ou teste de Mann-Whitney foram utilizados de acordo com a normalidade dos dados para a comparação das características físicas e hemodinâmicas basais e também utilizados nas variáveis sanguíneas e teciduais entre os grupos CS e DAC. De acordo com a normalidade ou não dos dados foram realizadas a correlação de *Pearson* ou de *Spearman* para as associações entre a expressão dos miRNAs e do fluxo sanguíneo periférico, e dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do VEGF. Para as análises das variáveis durante os protocolos experimentais de exercício foi utilizada a ANOVA (*two-way*) para medidas repetidas. Quando necessário, o teste *post-hoc* de *Scheffe* foi aplicado para determinar a diferença entre os grupos. Para a comparação da resposta das variáveis ao longo do exercício os dados foram expressos como área sob a curva (A.S.C.) e foi utilizado o teste T de Student para amostras independentes para comparação dessas respostas entre os grupos. Foi aceito como diferença significativa em todas as análises um $p < 0,05$.

Resultados

5-RESULTADOS

De um total de 145 voluntários pré-selecionados no ambulatório de Coronariopatia Crônica do InCor HCFMUSP ou selecionados na comunidade, 69 aceitaram participar do protocolo de pesquisa. Destes, 36 participantes atingiram todos os critérios de inclusão e exclusão, sendo 22 pacientes com DAC e 14 voluntários saudáveis. Os demais 33 voluntários foram excluídos por diversos fatores que estão apresentados na Figura 14.

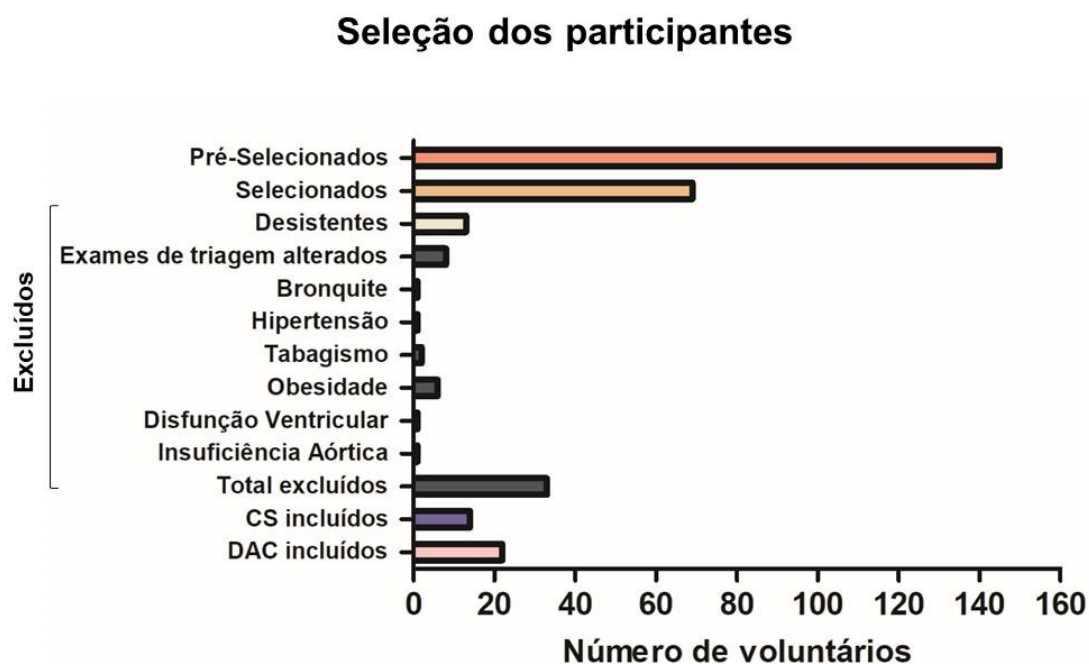


Figura 14. Gráfico demonstrativo da inclusão e exclusão de participantes no protocolo. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana.

5.1 Características físicas, funcionais, laboratoriais e clínicas

As características físicas, funcionais e laboratoriais do grupo CS e do grupo DAC são mostradas na Tabela 2. Não observamos diferenças significativas entre os grupos em relação ao sexo, idade, peso, estatura, IMC, força máxima nos exercícios de *handgrip* (mão) e *leggrip* (perna) e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Em relação aos dados laboratoriais não observamos diferenças significativas para lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicérides entre os grupos. A glicemia de jejum apresentou uma tendência ($p= 0,06$) a ser maior no grupo DAC em relação ao CS. As taxas de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e não-HDL foram significativamente menores no grupo DAC quando comparado ao CS (Tabela 2). Com isso podemos observar que a utilização de estatinas está otimizada nos pacientes com DAC.

Na Tabela 3 estão dispostas as características clínicas e medicações dos grupos CS e DAC. Na caracterização clínica dos pacientes com DAC, podemos observar a presença de comorbidades associadas, angina instável (AI), infarto agudo do miocárdio (IAM) e revascularização do miocárdio (RM) prévios, procedimentos de cineangiocoronariografia (CATE) e divisão da gravidade da doença por número de artérias acometidas, angioplastia transluminal coronária (ATC), número de *stents* utilizados, bem como, as medicações dos pacientes com DAC.

Tabela 2. Características físicas, funcionais e laboratoriais em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	Grupos		Valor de P
	CS (n=14)	DAC (n=22)	
Características Físicas			
Sexo (Masculino/Feminino)	(10/4)	(16/6)	0,93
Idade (anos)	52 ± 2	55 ± 1	0,10
Peso (kg)	69,7 ± 3,4	73,6± 2,5	0,35
Estatura (m)	1,68 ± 0,02	1,67 ± 0,02	0,74
IMC (kg/m²)	25± 1	26 ± 1	0,08
Características Funcionais			
FEVE (%)	58 ± 1	56 ± 1	0,42
Força Máxima Braço (kgf)	36 ± 3	35 ± 2	0,85
Força Máxima Perna (kgf)	21 ± 3	27 ± 2	0,11
Características Laboratoriais			
Triglicérides (mg/dL)	102 ± 8	107 ± 14	0,55
HDL-colesterol (mg/dL)	51 ± 3	48 ± 2	0,42
LDL-colesterol (mg/dL)	125 ± 4	99 ± 12	0,00
não-HDL-colesterol (mg/dL)	145 ± 4	120 ± 12	0,00
Colesterol Total (mg/dL)	197 ± 7	168 ± 12	0,01
Glicemia de Jejum (mg/dL)	99 ± 2	107 ± 3	0,06

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana; IMC, índice de massa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 3. Características clínicas e medicações em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis, n (%)	Grupos	
	CS (n=14)	DAC (n=22)
Comorbidades associadas, n (%)		
Hipertensão	-	16 (73)
Ex-tabagista	-	11 (50)
Dislipidemia	-	22 (100)
Diabetes Mellitus tipo 2	-	2 (9)
Cineangiocoronariografia, n (%)	-	22 (100)
DAC uniarterial	-	6 (27)
DAC biarterial	-	11 (50)
DAC triarterial	-	5 (23)
Eventos prévios, n (%)		
AI	-	7 (32)
IAM	-	15 (68)
Tratamento intervencionista, n (%)		
RM	-	8 (36)
ATC	-	13 (59)
1 stent	-	2 (9)
2 stents	-	5 (23)
3 ou mais stents	-	6 (27)
Medicações, n (%)		
Betabloqueadores	-	19 (86)
Estatinas	-	22 (100)
Antiagregantes plaquetários	-	22 (100)
Inibidores da ECA/Bloqueadores AT1	-	12 (55)

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana; AI, angina instável; IAM, infarto agudo do miocárdio; RM, revascularização do miocárdio; ATC, angioplastia transluminal coronária; ECA, enzima conversora de angiotensina; AT1, receptor de angiotensina 1.

5.2 Expressão dos miRNAs circulantes e teciduais

Para responder o objetivo 1 do estudo, avaliamos a expressão dos miRNAs -126, -16, -21 e -92a no sangue total e no músculo esquelético do grupo de pacientes com DAC e no grupo de indivíduos CS.

A seguir na Figura 15 estão apresentadas as expressões dos miRNAs -126, -16, -21 e -92a no sangue total de pacientes com DAC e no grupo CS. Podemos observar que os miRNAs -126 ($p= 0,02$), -16 ($p= 0,02$) e -21 ($p= 0,00$) encontram-se significativamente reduzidos nos pacientes com DAC quando comparados com o grupo CS. Entretanto, não observamos nenhuma diferença entre os grupos DAC e CS para a expressão do miRNA-92a ($p= 0,11$).

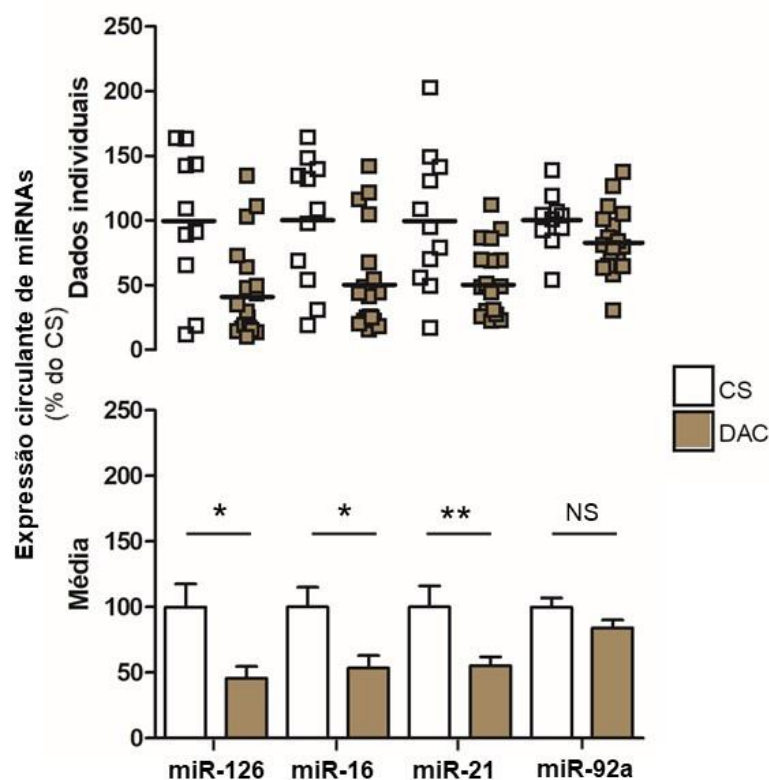


Figura 15. Dados individuais (Painel superior) e valores médios (Painel inferior) da expressão de miRNAs-126, -16, -21 e -92a circulantes no sangue total, nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $=p < 0,05$ vs. CS; ** $=p < 0,01$ vs. CS; NS= diferença estatisticamente não significativa.

As expressões dos miRNAs -126, -16, -21 e -92a medidas no músculo esquelético de pacientes com DAC e no grupo CS estão apresentadas na Figura 16. Assim como foi observado na medida do sangue total, os miRNAs -126 ($p= 0,03$), -16 ($p= 0,03$) e -21 ($p= 0,04$) encontram-se significativamente reduzidos nos pacientes com DAC quando comparados com o grupo CS. Contudo, a expressão do miRNA-92a no tecido apresentou uma tendência em estar reduzido ($p= 0,07$) no grupo DAC em relação ao CS.

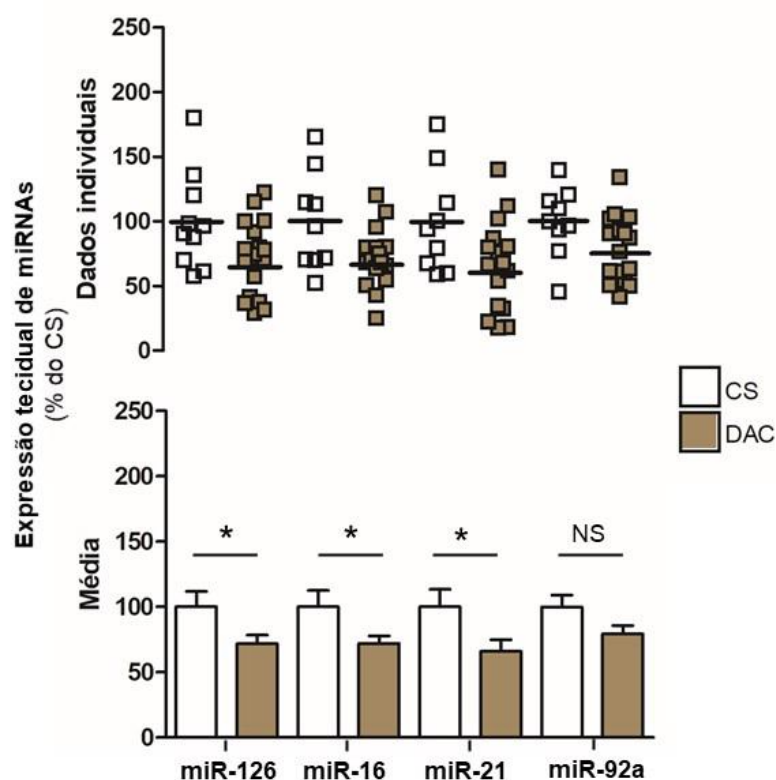


Figura 16. Dados individuais (Painel superior) e valores médios (Painel inferior) da expressão de miRNAs-126, -16, -21 e -92a teciduais, nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * = $p < 0,05$ vs. CS; NS= diferença estatisticamente não significativa.

5.3 Expressão gênica e proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético

Para responder o objetivo 2 do estudo, avaliamos a expressão gênica e proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos do grupo de pacientes com DAC e no grupo de indivíduos CS.

5.3.1 Expressão gênica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético

Na Figura 17, a expressão gênica tecidual do fator antiangiogênico PI3KR2 foi significativamente ($p=0,02$) maior no grupo DAC quando comparado ao grupo CS. Por outro lado, diferente do esperado, a expressão gênica tecidual da iNOS foi significativamente ($p=0,02$) menor no grupo DAC em relação ao CS. Além disso, o fator de sobrevivência celular, Bcl-2 foi significativamente ($p= 0,01$) menor no grupo DAC em relação ao grupo CS.

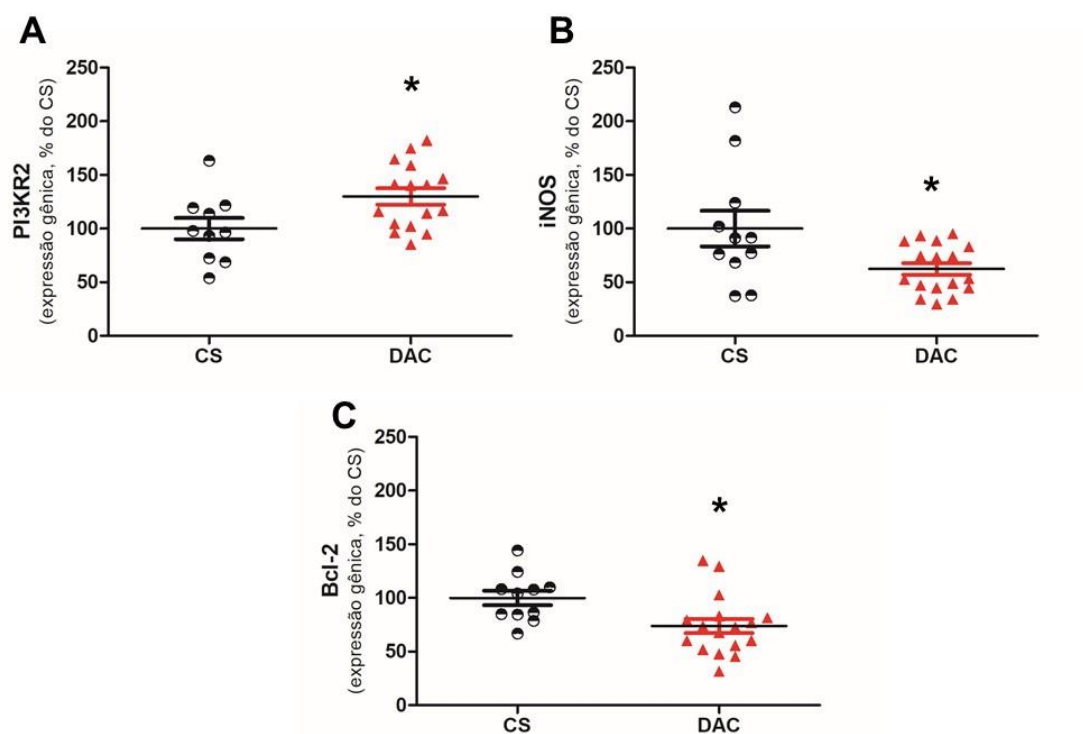


Figura 17. Dados individuais e valores médios da expressão gênica tecidual dos fatores antiangiogênicos PI3KR2 (Painel A) e iNOS (Painel B); e do fator angiogênico de sobrevivência celular Bcl-2 (Painel C) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). $^* = p < 0,05$ vs. CS.

Na Tabela 4 estão representadas as expressões gênicas teciduais dos fatores antiangiogênicos Spred-1, Bad e Bax e também, dos fatores angiogênicos eNOS, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 e HIF-1 α . Para estes fatores, observamos que não houve nenhuma diferença entre o grupo DAC e o grupo CS.

Tabela 4. Expressão gênica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos da via do VEGF em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

	CS (n=14)	DAC (n=22)	Valor de P
Fatores antiangiogênicos			
Spred-1	100 ± 4	105 ± 4	0,40
Bad	100 ± 17	92 ± 8	0,64
Bax	100 ± 9	111 ± 7	0,34
Fatores angiogênicos			
eNOS	100 ± 6	109 ± 9	0,44
VEGF-A	100 ± 18	120 ± 11	0,31
VEGFR-1	100 ± 7	105 ± 8	0,65
VEGFR-2	100 ± 11	114 ± 11	0,36
HIF-1α	100 ± 6	95 ± 4	0,47

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana.

5.3.2 Expressão proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos no músculo esquelético

A seguir estão representadas as expressões proteicas dos fatores angiogênicos, antiangiogênicos, de apoptose e sobrevivência celular. Na Figura 18, observamos que os fatores antiangiogênicos: iNOS (Figura 18A, $p=0,75$) e PI3KR2 (Figura 18B, $p=0,75$) não são diferentes entre os grupos DAC e CS. Porém a expressão do fator apoptótico Bad (Figura 18C, $p=0,02$) está significativamente aumentado no grupo DAC quando comparado ao CS.

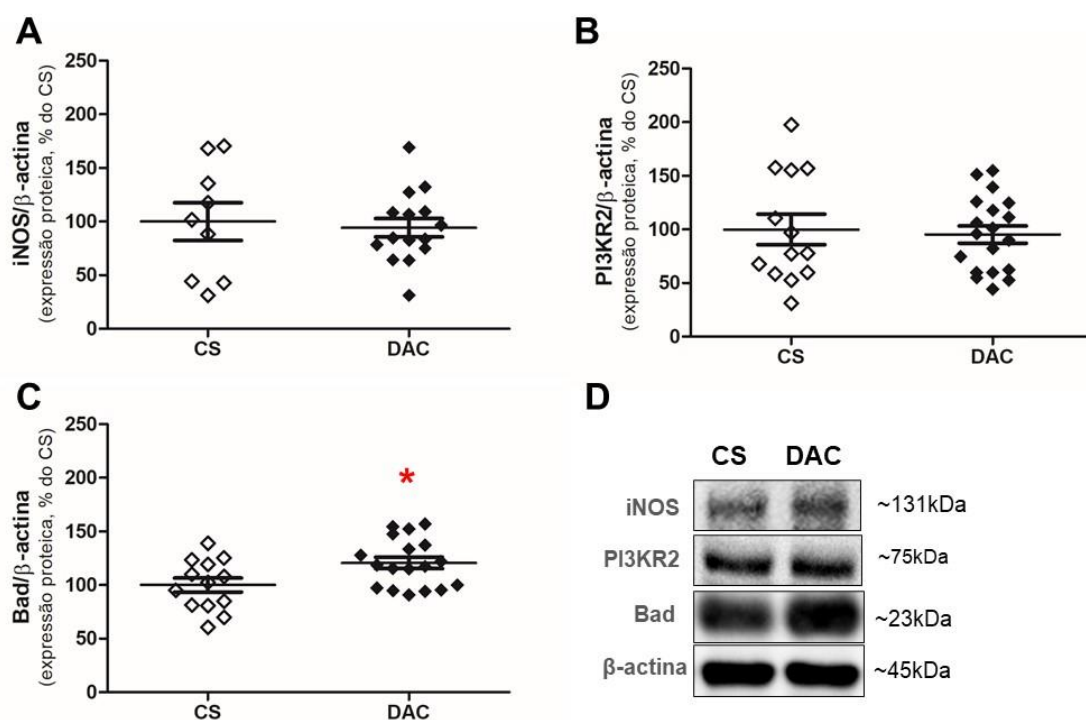


Figura 18. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores antiangiogênicos iNOS (Painel A), PI3KR2 (Painel B) e apoptótico Bad (Painel C) e os *blots* representativos de cada proteína (Painel D) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). *= $p < 0,05$ vs. CS.

Na Figura 19, observamos que as expressões proteicas teciduais dos fatores angiogênicos, VEGF-A (Figura 19A, $p = 0,69$), PI3K (Figura 19C, $p = 0,20$) e p-eNOS/eNOS total (Figura 19E, $p = 0,31$), não foram significativamente diferentes entre os grupos DAC e CS. Entretanto, observamos uma tendência na p-Akt/Akt total (Figura 19D, $p = 0,06$) a ser menor no grupo DAC em relação ao grupo CS. Por outro lado, a expressão proteica do VEGFR-2 (Figura 19B, $p = 0,03$) foi significativamente maior no grupo DAC quando comparado ao CS.

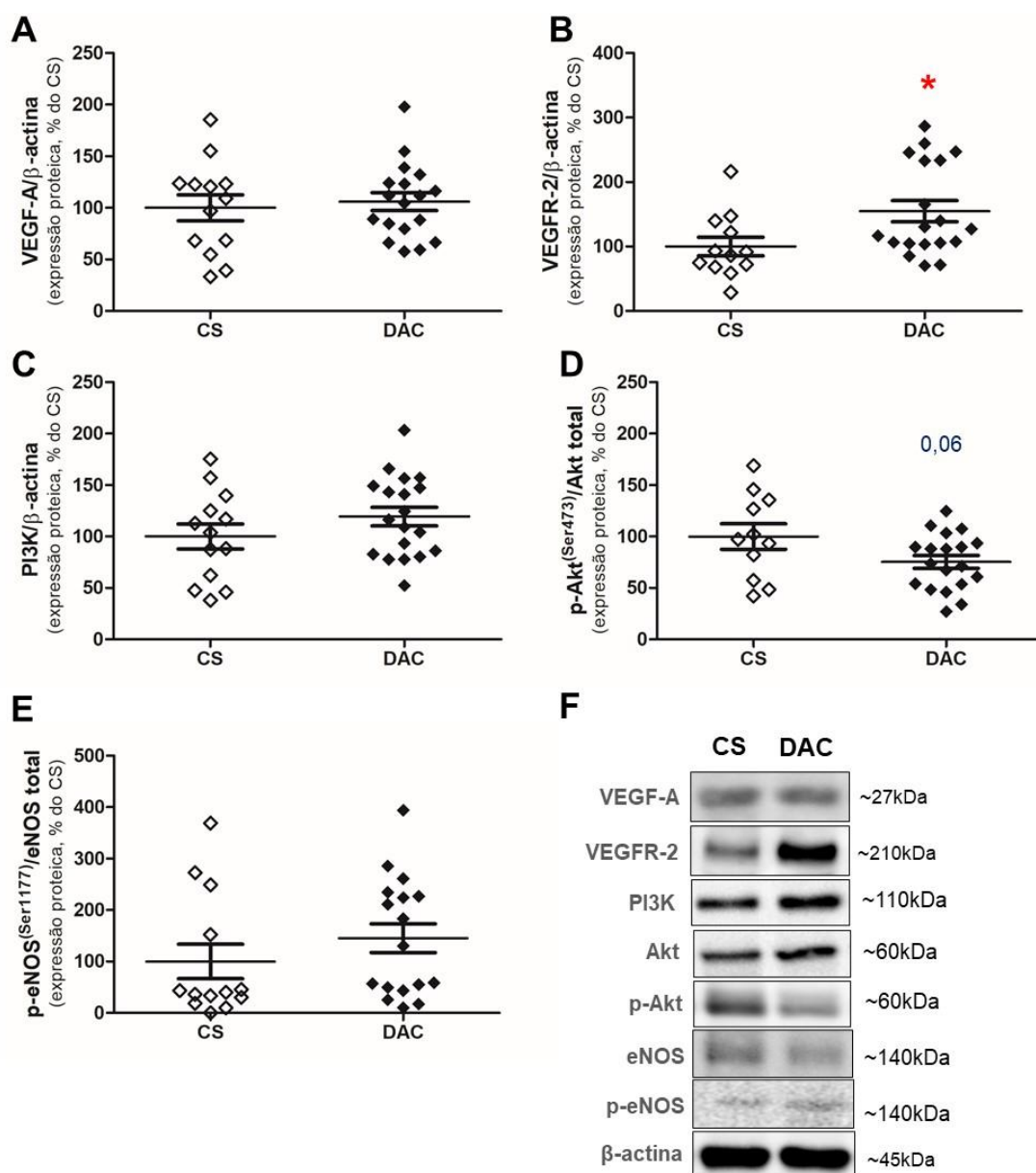


Figura 19. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores angiogênicos VEGF-A (Painel A), VEGFR-2 (Painel B), PI3K (Painel C), p-Akt/Akt total (Painel D), p-eNOS/eNOS (Painel E) e os blots representativos de cada proteína (Painel F) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). *= $p < 0,05$ vs. CS.

Já, na Figura 20, estão representadas as expressões proteicas teciduais dos fatores angiogênicos e de sobrevivência celular. As expressões da c-Raf (Figura 20A, $p = 0,14$) e HIF-1 α (Figura 20D, $p = 0,98$) foram semelhantes entre os grupos DAC e CS. Contudo, a p-ERK1/2/ERK1/2 total foi significativamente

menor ($p= 0,047$) no grupo DAC em relação ao CS (Figura 20B). Entretanto, observamos que a expressão de Bcl-2 foi significativamente maior ($p= 0,01$) no grupo DAC quando comparado com o grupo CS (Figura 20C).

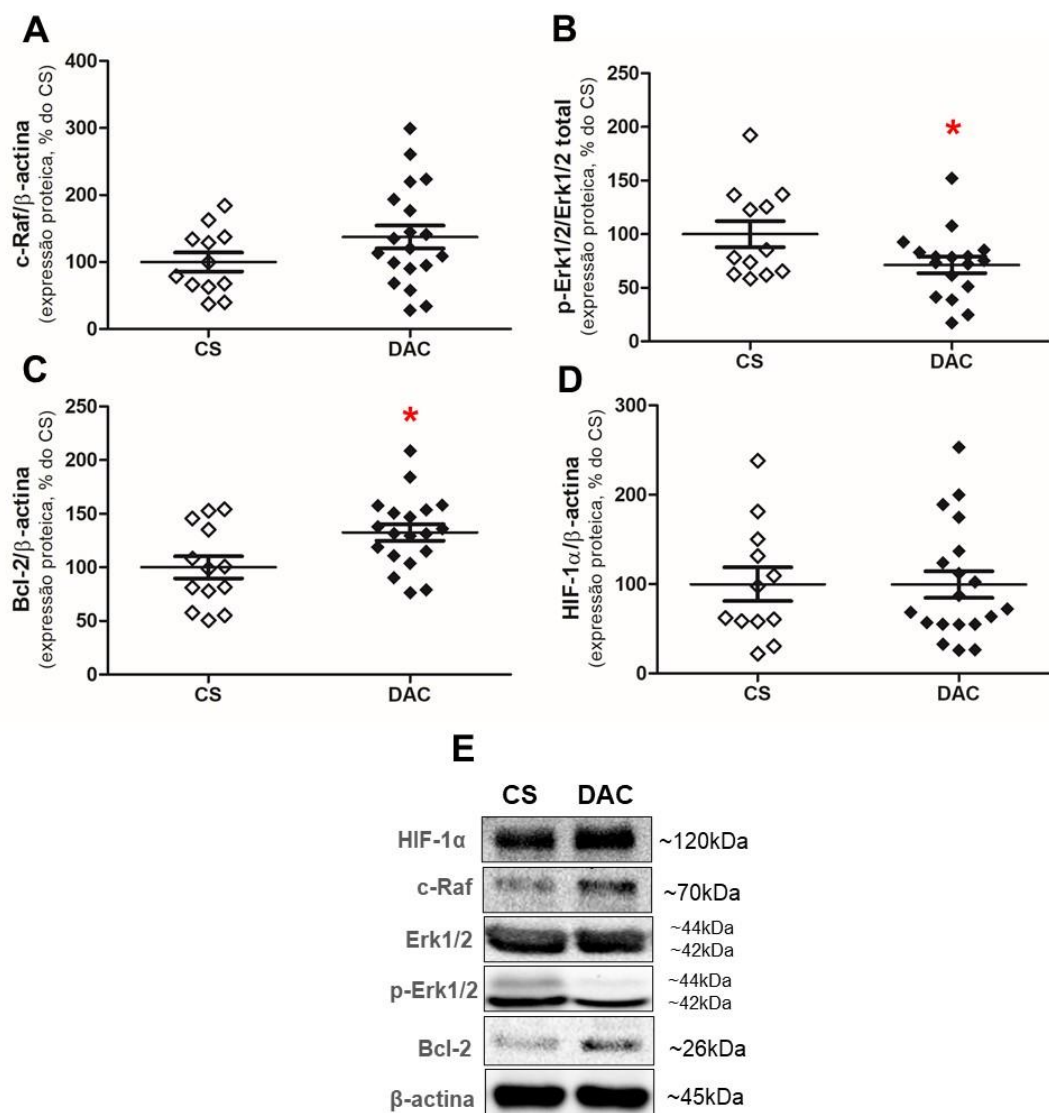


Figura 20. Dados individuais e valores médios da expressão proteica dos fatores angiogênicos e de sobrevivência celular, c-Raf (Painel A), p-ERK1/2/ERK1/2 total (Painel B), Bcl-2 (Painel C), HIF-1 α (Painel D) e blots representativos de cada proteína (E) dos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). * = $p < 0,05$ vs. CS.

5.4 Características hemodinâmicas e vasculares

Para responder o objetivo 3 do estudo, avaliamos o fluxo sanguíneo periférico em repouso e durante o exercício do grupo de pacientes com DAC e no grupo de indivíduos CS.

5.4.1 Repouso

Protocolo Experimental 1 - Braço

Em repouso, o FSM e a CVA foram semelhantes entre os grupos DAC e CS. Da mesma forma, não observamos diferenças entre os grupos na PAM e FC (Tabela 5).

Tabela 5. Características hemodinâmicas e vasculares em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis – Protocolo Experimental 1 (Braço)

Variáveis	CS (n=12)	DAC (n=21)	Valor de P
FSM (ml/min/100ml)	1,97 ± 0,16	1,84 ± 0,15	0,61
CVA (u.a.)	1,96 ± 0,14	1,76 ± 0,14	0,37
PAM (mmHg)	101 ± 2	103 ± 3	0,60
FC (bpm)	63 ± 1	62 ± 2	0,76

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana; FSM, fluxo sanguíneo muscular; CVA, condutância vascular do antebraço; PAM, pressão arterial média. FC, frequência cardíaca

Protocolo Experimental 2 - Perna

No protocolo experimental da perna, o FSM, a CVP, a PAM e a FC em repouso não foram diferentes entre os grupos DAC e CS (Tabela 6).

Tabela 6. Características hemodinâmicas e vasculares em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis – Protocolo Experimental 2 (Perna)

Variáveis	CS (n=7)	DAC (n=16)	Valor de <i>P</i>
FSM (ml/min/100ml)	1,73 ± 0,06	1,48 ± 0,09	0,15
CVP (u.a.)	1,89 ± 0,08	1,69 ± 0,10	0,33
PAM (mmHg)	92 ± 3	88 ± 2	0,46
FC (bpm)	68 ± 3	61 ± 2	0,09

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. CS, controle saudável; DAC, doença arterial coronariana; FSM, fluxo sanguíneo muscular; CVA, condutância vascular do antebraço; PAM, pressão arterial média. FC, frequência cardíaca

5.4.2 Durante o exercício

Protocolo Experimental 1 - Braço

Os resultados hemodinâmicos e vasculares durante o exercício de preensão de mão (*handgrip*) realizado a 30% da CVM dos grupos CS e DAC estão apresentados abaixo.

O FSM, PAM e FC aumentaram significativamente durante o exercício em ambos os grupos (Tabela 7). Ainda, observamos que durante o exercício, o grupo DAC apresentou nível de FSM significativamente menor quando comparado ao grupo CS ($p=0,04$). E, análises adicionais mostraram que a resposta (ASC) do FSM foi significativamente menor ($p< 0,01$) no grupo DAC quando comparado ao grupo CS. Durante o exercício, os níveis de PAM

aumentaram significativamente no grupo DAC e CS ($p=0,00$ e $p=0,00$, respectivamente), e o mesmo ocorreu para a FC ($p=0,01$; DAC e $p=0,00$; CS). Ainda, as respostas (ASC) de PAM e FC não foram diferentes entre os grupos (Tabela 7).

A CVA aumentou durante o exercício somente no grupo CS ($p < 0,01$, Figura 21XA) e foi significativamente menor ($p= 0,00$) no grupo DAC em relação ao CS. Assim, a resposta ao exercício (ASC) de CVA foi significativamente menor ($p= 0,02$) no grupo DAC quando comparado ao grupo CS, (Figura 21B). Estes resultados evidenciam que pacientes com DAC apresentam uma vasodilatação comprometida durante o exercício.

Tabela 7. Características hemodinâmicas e vasculares durante o exercício de preensão de mão (handgrip) em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	CS (n=12)			DAC (n=21)		
	Repouso	3 min	A.S.C.	Repouso	3 min	A.S.C.
FSM (ml/min/100ml)	1,97±0,16	3,22±0,27*	8 ± 1	1,84±0,15	2,31±0,19*†	6 ± 1†
PAM (mmHg)	101 ± 2	114 ± 3*	324 ± 6	103 ± 3	118 ± 3*	331 ± 11
FC (bpm)	64 ± 1	73 ± 3*	208 ± 5	62 ± 2	68 ± 3*	199 ± 9

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. A.S.C, área sob a curva (resposta); FSM, fluxo sanguíneo muscular; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca. * = $P < 0,05$ vs. Repouso CC. † = $P < 0,05$ vs. CS.

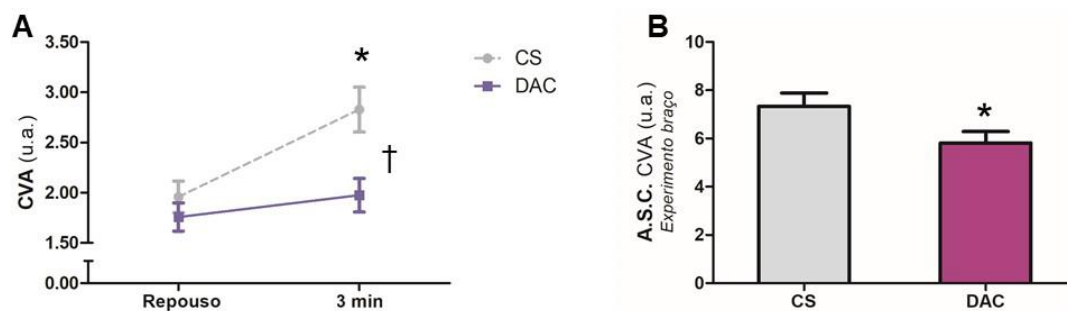


Figura 21. Condutância vascular do antebraço (CVA) durante o exercício de preensão de mão (*handgrip*) realizado a 30% da contração voluntária máxima (Painel A) e resposta ao exercício (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (C). ASC, área sob a curva. * = $P < 0,05$ vs. Repouso. † = $P < 0,05$ vs. CS.

Protocolo Experimental 2 – Perna

Os resultados hemodinâmicos e vasculares durante o exercício de perna realizado a 30% da CVM dos grupos DAC e CS estão apresentados abaixo.

O FSM aumentou significativamente durante o exercício em ambos os grupos, sendo que durante o exercício observamos que o FSM foi significativamente menor ($p = 0,04$) no grupo DAC quando comparado ao CS (Tabela 8). Além disso, a resposta (ASC) foi menor no grupo DAC em relação ao grupo CS ($p = 0,01$; Tabela 8). Não houveram diferenças na PAM e FC durante o exercício e nem nas respostas entre os grupos (Tabela 8). Além disso, não observamos aumento da CVP durante o exercício em ambos os grupos, porém durante o exercício observamos que o grupo DAC apresenta níveis de CVP significativamente menor ($p = 0,02$) do que o grupo CS (Figura 22A). Já, a resposta (ASC) de CVP durante o exercício foi significativamente menor ($p = 0,01$) no grupo DAC comparado ao grupo CS (Figura 22B).

Tabela 8. Características hemodinâmicas e vasculares durante o exercício de perna em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	CS (n=7)			DAC (n=16)		
	Repouso	3min	A.S.C.	Repouso	3min	A.S.C.
FSM (ml/min/100ml)	1,73±0,06	2,16±0,10*†	6 ± 0	1,48±0,09	1,78±0,09*	5 ± 0†
PAM (mmHg)	92 ± 3	109 ± 5*	300 ± 16	88 ± 2	113 ± 3*	302 ± 8
FC (bpm)	68 ± 3	81 ± 3*	229 ± 9	61 ± 2	76 ± 3*	210 ± 8

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. A.S.C, área sob a curva (resposta); FSM, fluxo sanguíneo muscular. PAM, pressão arterial média. FC, frequência cardíaca *= $P < 0,05$ vs. Repouso CC. †= $P < 0,05$ vs. CS.

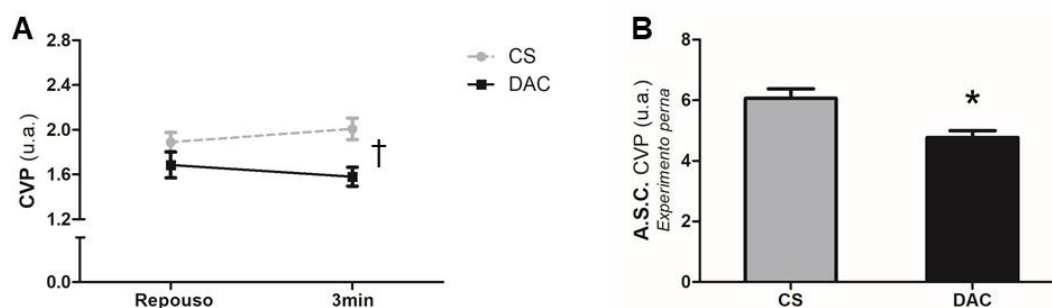


Figura 22. Condutância vascular da perna (CVP) durante o exercício de perna realizado a 30% da contração voluntária máxima (Painel A) e resposta ao exercício (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (C). ASC, área sob a curva. *= $P < 0,05$ vs. Repouso. †= $P < 0,05$ vs. CS.

5.5 Padrão de fluxo (shear rate) na artéria braquial e femoral em repouso

5.5.1 Experimento na artéria braquial

Os resultados de padrão de fluxo sanguíneo braquial em repouso estão apresentados a seguir.

O diâmetro da artéria braquial foi semelhante entre os grupos DAC e CS ($p = 0,078$; Figura 23). Em relação ao padrão de *Shear Rate* (SR) podemos observar que o SR anterógrado e SR médio, representativos do padrão de

fluxo laminar na parede da artéria, foram significativamente menores no grupo DAC quando comparado com o grupo CS ($p=0,046$, $p=0,01$, respectivamente; Figuras 24A e 24B). Já, em relação aos índices envolvidos com o fluxo mais turbilhonado na parede arterial, observamos que o *SR* retrógrado foi similar entre os grupos ($p=0,26$; Figura 24C). Entretanto, houve uma tendência para o *SR* oscilatório ser maior no grupo DAC em relação ao CS ($p=0,08$; Figura 24D).

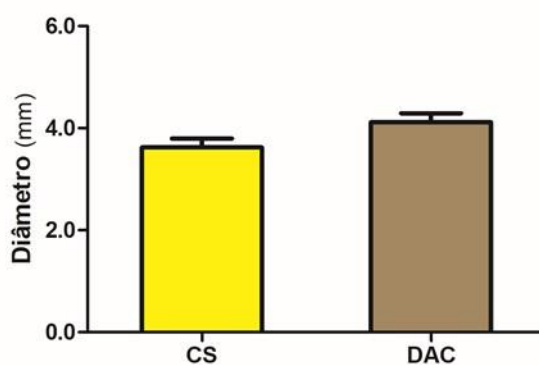


Figura 23. Diâmetro da artéria braquial nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS).

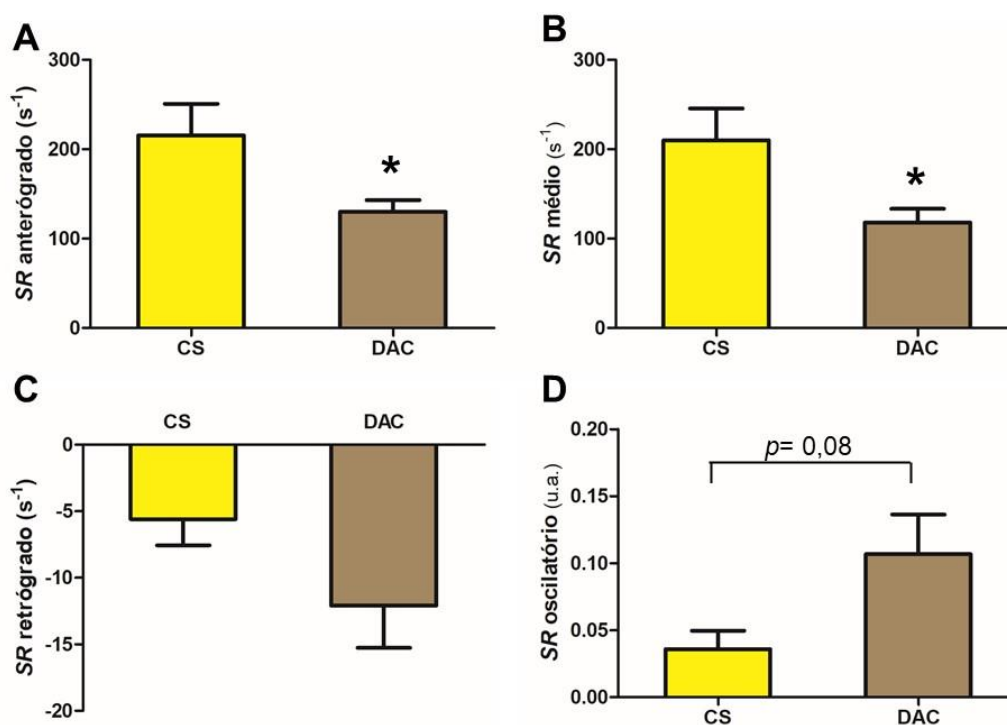


Figura 24. Padrão de *Shear Rate* (SR) da artéria braquial nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (C). SR anterógrado (Painel A), SR médio (Painel B), SR retrógrado (Painel C) e SR oscilatório (Painel D). Grupo DAC (n=18), grupo C (n=10). *= $p < 0,05$ vs. CS.

5.5.2 Experimento na artéria femoral

Os resultados de padrão de fluxo sanguíneo femoral em repouso estão apresentados a seguir. O diâmetro da artéria femoral, o SR retrógrado e SR oscilatório foram semelhantes entre os grupos DAC e CS. Por outro lado, o SR anterógrado e o SR médio foram significativamente menores ($p = 0,01$ e $p = 0,03$, respectivamente) no grupo DAC comparado ao CS como pode ser observado na Tabela 9. Esses achados sugerem que pacientes com DAC apresentam um fluxo laminar reduzido na artéria femoral, porém não foi

observado nenhuma diferença em relação ao fluxo turbilhonado em relação aos indivíduos CS.

Tabela 9. Padrão de *shear rate* na artéria femoral em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	CS (n=9)	DAC (n=20)	Valor de P
Diâmetro (mm)	5,91 ± 0,28	5,80 ± 0,18	0,75
SR Anterógrado (s ⁻¹)	96,58 ± 7,81	72,82 ± 4,14	0,01
SR Retrógrado (s ⁻¹)	-29,42 ± 4,04	-26,25 ± 2,64	0,52
SR Médio (s ⁻¹)	67,16 ± 8,55	46,57 ± 4,34	0,03
SR Oscilatório (s ⁻¹)	0,23 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,42

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média SR, *shear rate*.

5.6 Associação dos miRNAs com os fatores angiogênicos e antiangiogênicos

Para responder o objetivo 4 do estudo, analisamos a associação dos miRNAs -126, -16, -21 e -92a com as expressões proteicas dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos de interesse para cada alvo conhecido na via do VEGF.

Na Figura 25 observamos uma associação positiva entre a proteína PI3KR2 e o miRNA-126, o que foi contrário ao esperado, já que o miRNA-126 regula negativamente a expressão deste gene em nível pós-transcricional, podendo assim influenciar na expressão proteica.

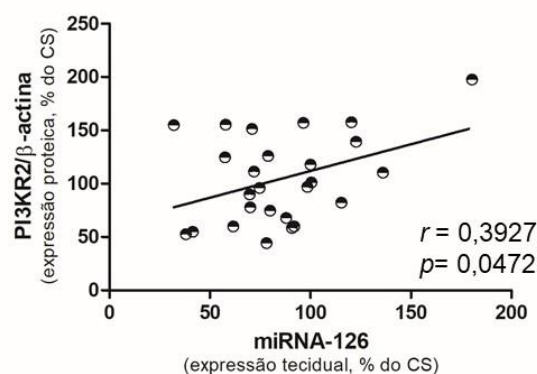


Figura 25. Associação entre a expressão do miRNA-126 tecidual e o seu alvo de interesse PI3KR2 nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r , correlação de Pearson.

Não foram observadas associações entre o miRNA-16 e os fatores Bcl-2 (Figura 26A) e VEGF-A (Figura 26B). Já, em relação ao miRNA-16 e a expressão proteica de VEGFR-2, observamos uma associação negativa (Figura 26C, $p = 0,04$), evidenciando desta maneira, uma regulação deste miRNA no seu gene-alvo de interesse, com consequente diminuição da expressão proteica.

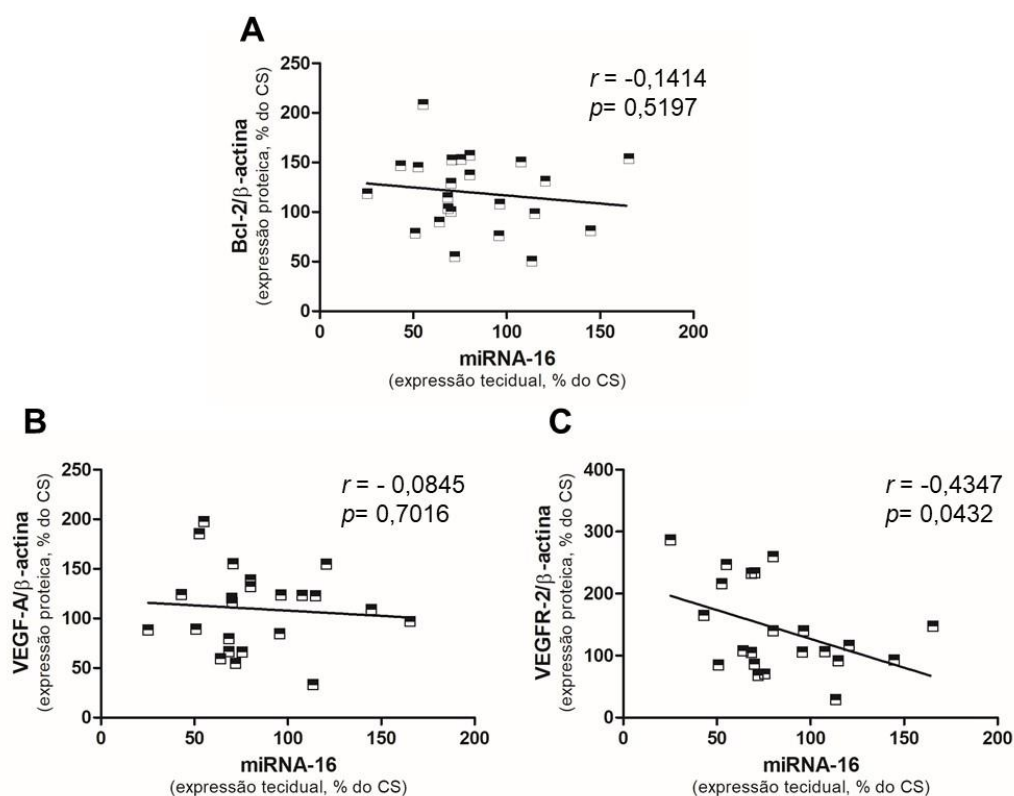


Figura 26. Associação entre a expressão do miRNA-16 tecidual e os seus alvos de interesse Bcl-2 (Painel A), VEGF-A (Painel B) e VEGFR-2 (Painel C) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r , correlação de Pearson.

A seguir apresentaremos as associações entre os miRNAs -21 e -92a teciduais com os fatores de interesse na via do VEGF. Não observamos associações significativas entre o miRNA-21 e os fatores Bcl-2 (Figura 27A) e p-eNOS/eNOS total (Figura 27B). Da mesma forma, não observamos associação entre o miRNA-92a e a p-eNOS/eNOS total (Figura 28). Esta ausência de associação reforça a ideia de uma regulação indireta destes miRNAs nestas vias de interesse.

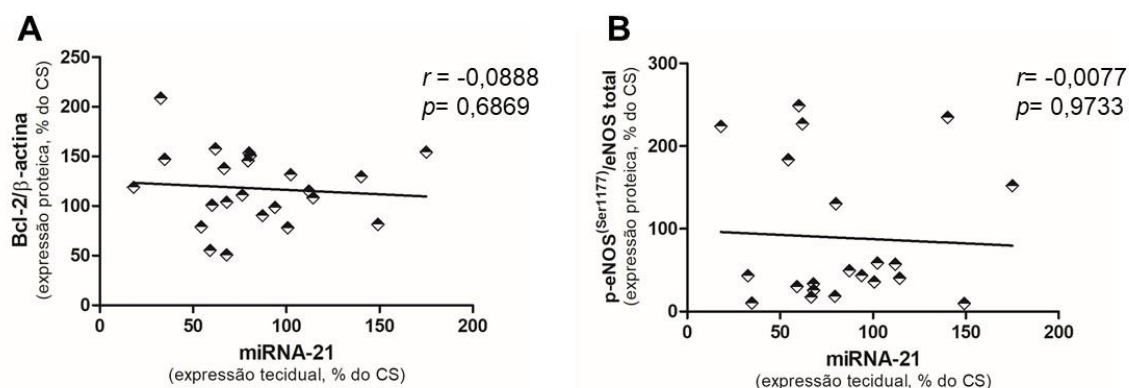


Figura 27. Associação entre a expressão do miRNA-21 tecidual e os seus alvos de interesse Bcl-2 (Painel A) e p-eNOS/eNOS total (Painel B) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r , correlação de Pearson.

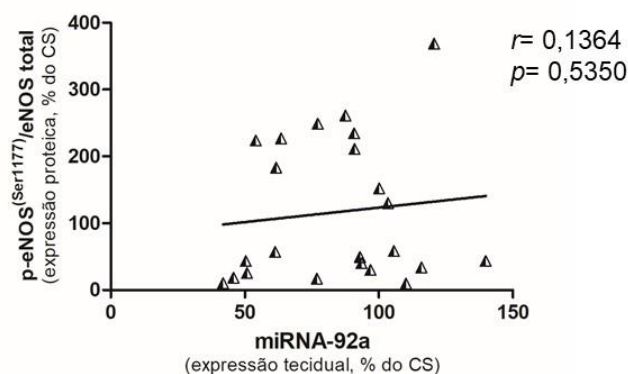


Figura 28. Associação entre a expressão do miRNA-92a tecidual e o seu alvo de interesse p-eNOS/eNOS total nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). r , correlação de Pearson.

5.7 Associação dos miRNAs com o fluxo sanguíneo periférico

Para responder o objetivo 5 do estudo, analisamos as associações entre os miRNAs -126, -16, -21 e -92a circulantes e teciduais com o fluxo sanguíneo periférico em repouso dos grupos DAC e CS.

Na Tabela 10 são apresentadas as associações entre os miRNAs circulantes (c-miRNAs) e os parâmetros de *shear rate* e diâmetro tanto para a artéria braquial quanto para a artéria femoral.

Para a artéria braquial, as associações entre os c-miRNAs -126, -16, -21, e -92a e o diâmetro da artéria, *shear rate* (SR) médio, SR anterógrado, SR retrógrado e SR oscilatório não foram significativas. Nós apenas observamos uma tendência ($\rho = -0,39$; $p = 0,06$) para uma associação negativa entre o c-miRNA-92a e o diâmetro da artéria braquial. Além disso, não foram observadas associações entre os c-miRNAs e os parâmetros de *shear rate* e diâmetro da artéria femoral.

Tabela 10. Associações entre os miRNAs circulantes (c-miRNAs) e os parâmetros das artérias braquial e femoral em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	c-miRNAs							
	c-miR-126		c-miR-16		c-miR-21		c-miR-92a	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
Artéria Braquial								
Diâmetro (mm)	-0,16	0,48	0,04	0,84	-0,07	0,76	-0,39	0,06
SR médio (s^{-1})	0,21	0,35	0,10	0,64	0,13	0,55	0,26	0,21
SR anterógrado (s^{-1})	0,21	0,35	0,09	0,67	0,10	0,63	0,26	0,22
SR retrógrado (s^{-1})	0,01	0,96	0,78	0,47	0,16	0,47	0,19	0,37
SR oscilatório (u.a.)	-0,13	0,55	-0,11	0,61	-0,18	0,40	-0,22	0,29
Artéria Femoral								
Diâmetro (mm)	0,05	0,84	0,21	0,33	0,03	0,89	-0,07	0,76
SR médio (s^{-1})	-0,09	0,70	-0,16	0,47	-0,08	0,72	-0,17	0,42
SR anterógrado (s^{-1})	0,01	0,96	-0,06	0,80	-0,05	0,80	-0,27	0,21
SR retrógrado (s^{-1})	-0,25	0,25	-0,23	0,27	-0,07	0,75	-0,08	0,70
SR oscilatório (u.a.)	0,17	0,44	0,20	0,35	0,04	0,87	0,17	0,44

Os valores de correlação e de p estão apresentados na tabela. ρ , correlação de Spearman; SR, shear rate.

Na Tabela 11 são apresentadas as associações entre os miRNAs teciduais (t-miRNAs) e os parâmetros de *shear rate* e medida do diâmetro para a artéria femoral.

Nas associações entre os t-miRNAs e os parâmetros da artéria femoral, apenas observamos uma associação negativa significativa entre o t-miRNA-92a e o SR anterógrado ($\rho = -0,52$; $p = 0,02$), enquanto que para os demais parâmetros não houveram associações.

Tabela 11. Associações entre os miRNAs teciduais (t-miRNAs) e os parâmetros da artéria femoral em repouso em repouso em pacientes com doença arterial coronariana e indivíduos controle saudáveis

Variáveis	t-miRNAs							
	t-miR-126		t-miR-16		t-miR-21		t-miR-92a	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
Diâmetro (mm)	0,35	0,10	0,22	0,36	0,16	0,49	0,23	0,34
SR médio (s^{-1})	-0,08	0,71	-0,34	0,15	0,02	0,93	-0,35	0,13
SR anterógrado (s^{-1})	-0,10	0,67	-0,38	0,10	-0,08	0,75	-0,52	0,02
SR retrógrado (s^{-1})	-0,16	0,48	0,00	0,98	-0,01	0,96	0,27	0,26
SR oscilatório (u.a.)	0,28	0,20	0,28	0,24	0,13	0,58	0,13	0,59

Os valores de correlação e de p estão apresentados na tabela. ρ , correlação de Spearman; SR, shear rate.

A seguir, apresentaremos as associações entre os miRNAs circulantes (c-miRNAs) -126, -16, -21 e 92a e o FSM e CVA do experimento de braço em repouso e durante o exercício.

Na Tabela 12, são apresentadas as associações entre os c-miRNAs -126, -16, -21 e -92a e o FSM do experimento de braço em repouso e em reposta ao exercício. Como pode ser observado, os c-miRNAs -126, -16 e -21 apresentaram associações positivas com o FSM, tanto em repouso como em

resposta ao exercício. Entretanto, não observamos associação entre o c-miRNA-92a e o FSM.

Tabela 12. Associações entre os miRNAs circulantes e o fluxo sanguíneo muscular do braço em repouso e durante o exercício nos pacientes com doença arterial coronariana e nos indivíduos controle saudáveis

Variáveis	c-miRNAs							
	c-miR-126		c-miR-16		c-miR-21		c-miR-92a	
	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>	<i>rho</i>	<i>p</i>
Repouso								
FSM (mL/min/100mL)	0,54	<0,01	0,46	0,02	0,44	0,02	-0,11	0,59
Exercício								
FSM (ASC, mL/min/100mL)	0,65	<0,001	0,57	0,002	0,61	0,001	0,12	0,57

Os valores de correlação e de *p* estão apresentados na tabela. *rho*, correlação de Spearman; c-miRNAs, miRNAs circulantes; FSM, fluxo sanguíneo muscular. ASC, área sob a curva.

Observamos associações positivas significativas entre a CVA, tanto em repouso quanto durante o exercício, com os c-miRNAs -126 (Figuras 29A e 30A, respectivamente), -16 (Figuras 29B e 30B, respectivamente) e -21 (Figuras 29C e 30C, respectivamente) tanto em repouso quanto durante o exercício. Contudo, não vimos associação entre o c-miRNAs-92a e a CVA (Figuras 29D e 30D, respectivamente).

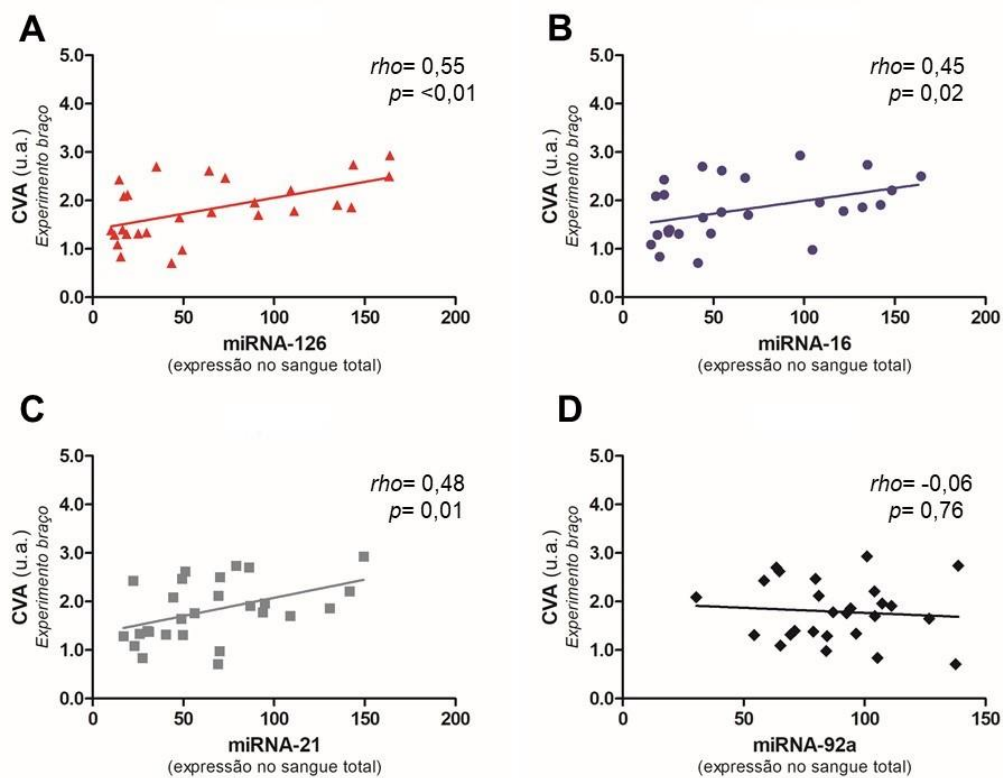


Figura 29. Associação entre a condutância vascular do antebraço **em repouso** e a expressão dos miRNAs circulantes. miRNA-126 ($\blacktriangle$, A), miRNA-16 ($\bullet$, B), miRNA-21 ($\blacksquare$, C) e miRNA-92a ($\blacklozenge$, D) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). ρ , correlação de Spearman.

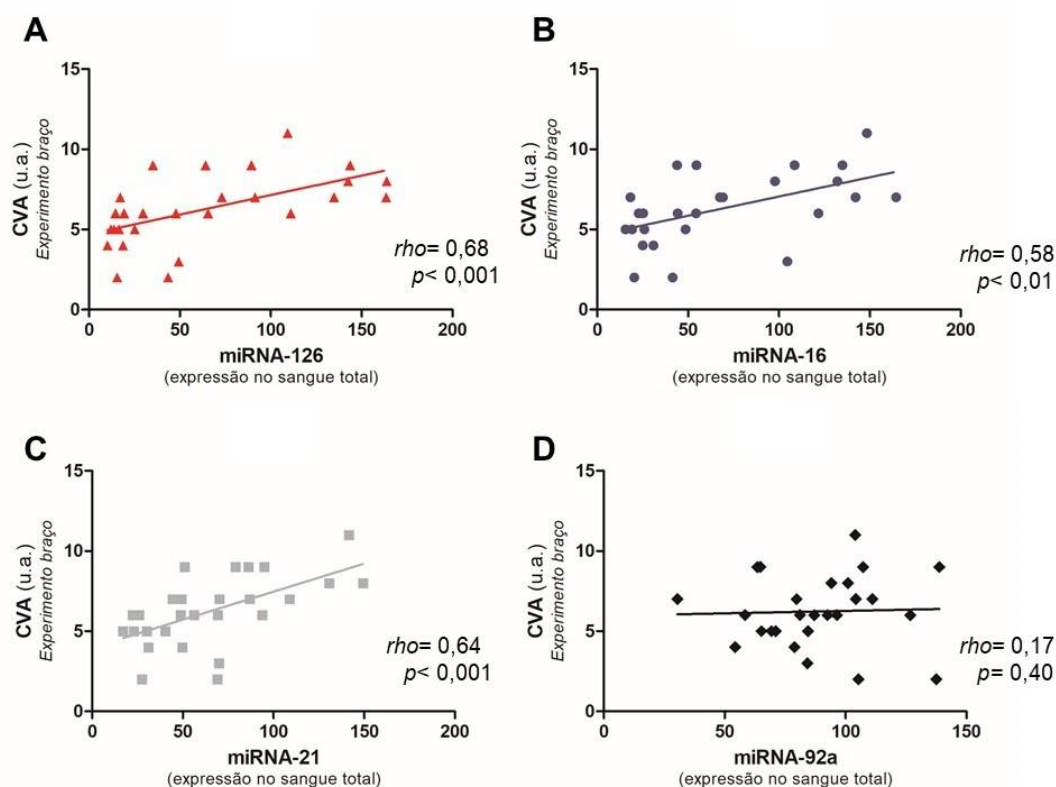


Figura 30. Associação entre a reposta (A.S.C.) de condutância vascular do antebraço durante o exercício de *handgrip* e a expressão dos miRNAs circulantes. miRNA-126 ($\blacktriangle$, A), miRNA-16 ($\bullet$, B), miRNA-21 ($\blacksquare$, C) e miRNA-92a ($\blacklozenge$, D) nos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e nos indivíduos controle saudáveis (CS). A.S.C., área sob a curva. ρ , correlação de Spearman.

Adicionalmente, analisamos a associação entre os miRNAs teciduais (t-miRNAs) e o FSM e CVP do experimento de perna, em repouso e em resposta ao exercício (ASC) (Tabela 13).

Observamos que o t-miRNA-16 ($r = 0,59$; $p = 0,02$) estava positivamente associado ao FSM em repouso, mas não com o exercício ($r = 0,43$; $p = 0,09$). Porém, observamos uma forte tendência ($r = 0,48$; $p = 0,06$) para uma associação positiva entre o t-miRNA-92a e a CVP em resposta ao exercício.

Tabela 13. Associações entre os miRNAs teciduais, fluxo sanguíneo muscular e condutância vascular da perna em repouso durante o do exercício de perna nos pacientes com doença arterial coronariana e nos indivíduos controle saudáveis

Variáveis	t-miRNAs							
	t-miR-126		t-miR-16		t-miR-21		t-miR-92a	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Repouso								
FSM (mL/min/100mL)	0,02	0,93	0,59	0,02	-0,02	0,95	0,35	0,18
CVP (u.a.)	-0,08	0,74	0,44	0,09	-0,16	0,56	0,42	0,10
Exercício								
FSM (ASC; mL/min/100mL)	0,20	0,45	0,43	0,09	-0,03	0,92	0,39	0,14
CVP (ASC; u.a.)	0,16	0,52	0,32	0,23	-0,03	0,92	0,48	0,06

Os valores de correlação e o de *p* estão apresentados na tabela. *r*, correlação de Pearson; t-miRNAs, miRNAs teciduais; FSM, fluxo sanguíneo muscular; CVP, condutância vascular da perna. ASC, área sob a curva.

A seguir estão apresentados os sumários dos dados de acordo com o seu objetivo.

Tabela 14. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 1, avaliação da expressão do miRNAs teciduais e circulantes, nos pacientes com DAC em relação ao CS.

Variáveis	DAC
Expressão t-miRNA-126	↓
Expressão t-miRNA-16	↓
Expressão t-miRNA-21	↓
Expressão t-miRNA-92a	↔
Expressão c-miRNA-126	↓
Expressão c-miRNA-16	↓
Expressão c-miRNA-21	↓
Expressão c-miRNA-92a	↔

↔ não é diferente, ↑ maior, ↓ menor

Tabela 15. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 2, avaliação da expressão gênica e proteica dos fatores angiogênicos e antiangiogênicos, nos pacientes com DAC em relação ao CS.

Variáveis	DAC
Expressão gênica:	
PI3KR2	↑
iNOS	↓
Bcl-2	↓
Expressão proteica:	
VEGFR-2	↑
Bcl-2	↑
p-ERK1/2/ERK1/2	↓
Bad	↑
VEGF-A	↔
PI3KR2	↔
PI3K	↔
p-Akt/Akt	↔
p-eNOS/eNOS	↔
iNOS	↔

↔ não é diferente, ↑ maior, ↓ menor

Tabela 16. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 3, avaliação do fluxo sanguíneo periférico, nos pacientes com DAC em relação ao CS.

Variáveis	DAC
CVA de repouso (<i>exp. braço</i>)	↔
CVA 3 min exercício (<i>exp. braço</i>)	↓
A.S.C. CVA (<i>exp. braço</i>)	↓
CVA de repouso (<i>exp. perna</i>)	↔
CVA 3 min exercício (<i>exp. perna</i>)	↓
A.S.C. CVA (<i>exp. perna</i>)	↓
Shear rate	
anterógrado (<i>braquial e femoral</i>)	↓
médio (<i>braquial e femoral</i>)	↓

retrógrado (<i>braquial e femoral</i>)	↔
oscilatório (<i>braquial e femoral</i>)	↔

↔ **não é diferente**, ↑ **maior**, ↓ **menor**

Figura 31. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 4, associação dos miRNAs com a expressão proteica.

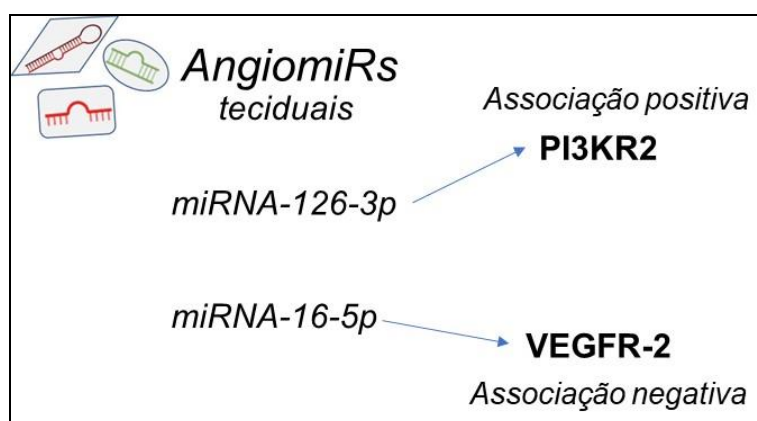
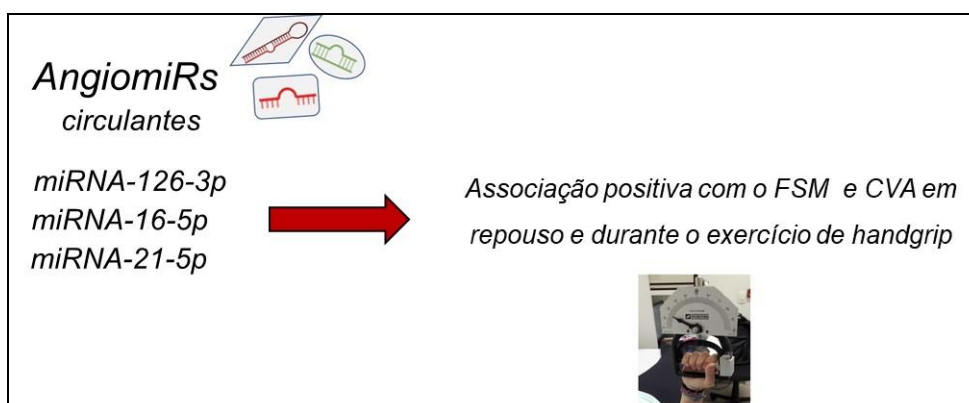


Figura 32. Sumário dos principais resultados relacionados ao objetivo 5, associação dos miRNAs com o fluxo sanguíneo periférico.



Discussão

6-DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo mostram que pacientes com DAC apresentam: 1) menor expressão dos miRNAs -126, -16 e -21 tanto circulantes quanto teciduais; 2) maior expressão gênica do PI3KR2 e menor expressão de Bcl-2 e iNOS; 3) maiores expressões proteicas de VEGFR-2, Bad e Bcl-2, e menor expressão de p-ERK1/2/ERK1/2; 4) menor resposta vasodilatadora durante o exercício de *handgrip* a 30%CVM e; 5) menor *shear rate* anterógrado e médio nas artérias braquial e femoral. Além disso, observamos que nesses pacientes, os miRNA-126 e -16 estavam associados à expressão da PI3KR2 e do VEGFR-2, respectivamente e; interessante, os c-miRNAs-126, -16 e -21 estavam associados com os níveis de FSM e CVA em repouso e com a resposta durante o exercício.

Conforme previamente descrito, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de expressão de quatro miRNAs, conhecidos como angiomiRs, envolvidos na via do VEGF e angiogênese vascular. Estudamos tanto os miRNAs circulantes (sangue total) quanto os teciduais (músculo esquelético), sendo que, até onde sabemos, somos os primeiros a investigar na literatura o perfil de expressão de miRNAs no músculo esquelético de pacientes com DAC e estudar a possível associação com seus diversos alvos na via do VEGF e também com o fluxo sanguíneo periférico, verificando assim o possível impacto funcional destes miRNAs nesses pacientes.

6.1 Perfil de expressão dos miRNAs e alterações moleculares

A expressão dos miRNAs -126, -16 e -21 já foram avaliadas em modelo animal de hipertensão, utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Fernandes et al.⁴⁶ demonstraram que estes miRNAs estavam relacionados com a rarefação microvascular, bem como, tinham como alvos genes angiogênicos e apoptóticos. Em nosso estudo identificamos que as expressões dos miRNAs -126, -16 e -21 estão reduzidas em pacientes com DAC, tanto na circulação quanto no tecido muscular quando comparados com os indivíduos do grupo CS. Nosso achado em relação ao miRNA -126 circulante está em acordo com estudos prévios da literatura. Fichtlscherer et al.⁵⁸ compararam amostras do plasma sanguíneo de pacientes com DAC e indivíduos saudáveis e observaram que a expressão do miRNA -126 estava diminuída na DAC. Adicionalmente, Zhang et al.⁵⁹ demonstraram que o miRNA-126 estava reduzido também em células progenitoras endoteliais isoladas do sangue total de pacientes com DAC quando comparados com controles saudáveis. Entretanto, esses achados não parecem ser um consenso, já que outros autores observaram que embora o miRNA-126 estivesse reduzido nas microvesículas circulantes, não estava reduzido no plasma de pacientes com DAC⁹⁰.

O miRNA-126 é abundante no endotélio vascular e está intimamente ligado a via angiogênica por alvejar diretamente dois genes importantes na via do VEGF, o PI3KR2 e o Spred-1^{47,60}. No nosso estudo observamos que a expressão gênica de PI3KR2 estava aumentada na DAC, mas a de Spred-1 não foi diferente entre o DAC e o CS. No entanto, quando olhamos para a expressão proteica da PI3KR2, esta não foi diferente no paciente DAC, mesmo

este apresentando uma diminuição da expressão de miRNA-126 tecidual. Uma possível explicação para este fato é que um mesmo gene pode ser alvejado por mais de um miRNA. Assim, podemos pensar que a expressão proteica não foi diferente devido à interferência de outros miRNAs nesta via.

Diferentemente da nossa hipótese inicial de que o miRNA-21 estaria aumentado na DAC, nós observamos uma expressão reduzida deste miRNA. Estudos prévios na literatura sobre a expressão do miRNA-21 circulante em pacientes com DAC são controversos. Um autor já demonstrou que esta expressão está aumentada⁷¹ e outro que está diminuída⁵⁸. E ainda, estudos *in vitro*, com *HUVECs*, mostram que existe aumento da expressão de miRNA-21 tanto com estímulo de *shear stress* oscilatório⁷⁶, o qual está associado a um perfil inflamatório, quanto a um estímulo de *shear stress* laminar⁷³, onde os autores observaram uma redução no seu alvo, PTEN, proteína que regula negativamente a via PI3K/Akt/eNOS. Assim, o aumento do miRNA-21 impactaria diretamente na diminuição do PTEN. No entanto, no nosso estudo não observamos associação do miRNA-21 com a expressão de eNOS nos pacientes com DAC como esperávamos, reforçando a ideia de que o miRNA-21 nesta via do VEGF parece não alvejar diretamente a eNOS.

Para esclarecer esta interação entre a PTEN e a eNOS, estudo utilizando células endoteliais aórticas humanas demonstrou que a PTEN regulava negativamente a atividade da eNOS por alterar o estado de fosforilação em S617 e S1179, e não por uma interação direta. Dessa maneira, esses resultados sugerem que PTEN deve exercer seus efeitos em outro ponto da via PI3K/Akt/eNOS⁹¹. Assim, é possível especular que ao contrário do que

esperávamos, o miRNA-21 pode estar influenciando positivamente a via angiogênica e, talvez até modulando o fluxo sanguíneo muscular.

Sabe-se que o miRNA-21 também pode regular a Bcl-2, fator de sobrevivência celular importante que atua conjuntamente com a via do VEGF na angiogênese. No nosso estudo, a expressão gênica de Bcl-2 estava diminuída, enquanto que a expressão proteica estava aumentada no paciente com DAC comparado ao indivíduo CS. O gene Bcl-2 é validado como alvo do miRNA-21 pelo programa TargetScan, entretanto, estudos têm mostrado que, na verdade, quando o miRNA-21 aumenta, também ocorre um aumento do Bcl-2, e com isso poderíamos imaginar ocorrer uma atuação indireta deste miRNA neste gene⁶⁹. De fato, estudo em células cancerígenas de glioma (U87MG) demonstrou que o miRNA-21 afetou o tratamento com Temozolomida (TMZ), medicação que induz a apoptose por aumentar a Bax, fator apoptótico, e diminuir a Bcl-2. Entretanto, as células U87MG que receberam superexpressão de miRNA-21 previamente ao tratamento com TMZ tiveram redução da razão Bax/Bcl-2. Os autores não discutem se o miRNA-21 alveja diretamente o fator antiapoptótico Bcl-2, mas provavelmente não, já que o aumento de miRNA-21 também levou ao aumento do Bcl-2⁶⁹. Deste modo, podemos inferir que possa existir uma regulação indireta do miRNA-21 sobre o fator de sobrevivência celular Bcl-2.

Importante lembrar que outro miRNA de interesse no nosso estudo que regula o fator de sobrevivência Bcl-2, o miRNA-16, estava diminuído nos pacientes com DAC comparado ao CS, e isto também foi diferente da nossa hipótese inicial. Este miRNA é reconhecido por estar fortemente associado com a sobrevivência celular, apoptose e proliferação, por alvejar diretamente VEGF,

VEGFR-2 e Bcl-2^{65,92,93}. Sabe-se que um único gene pode sofrer ação de vários miRNAs, sendo heterogênea a regulação dos genes-alvo. Dessa forma, um miRNA pode ser mais potente que outro, contribuindo para a diminuição ou aumento da expressão pós-transcricional daquele gene. Em relação aos nossos achados, parece que o miRNA-16 tem um papel de destaque nessa via, pois observamos o aumento da expressão proteica do VEGFR-2, alvo já validado também para o miRNA-16. O VEGFR-2 é um importante sinalizador para as cascatas PI3K/Akt/eNOS e Ras/Raf/MEK/ERK. Apesar do aumento da expressão proteica de VEGFR-2 na DAC, os fatores presentes nas duas cascatas de sinalização para a angiogênese, não tiveram aumento em suas expressões. Ao contrário, nós observamos uma redução da fosforilação da ERK1/2 e uma forte tendência para a fosforilação da Akt ser menor no grupo DAC comparado ao CS. Desta maneira, podemos especular que esta via de sinalização para angiogênese pode estar sofrendo modulações de outras vias e/ou outros miRNAs não avaliados no presente estudo.

Importante destacar que o miRNA-16 participa da regulação apoptótica e antiangiogênica. De fato, outros estudos envolvendo pacientes com doença arterial periférica⁹⁴ e mesmo em pacientes com DAC observaram que a expressão de miRNA-16 estava aumentada⁹⁵. Contudo, nossos achados corroboram estudo recente publicado por Wang et al.⁹⁶, em que esses autores, assim como nós, observaram que o miRNA-16 estava diminuído no plasma e em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com DAC em comparação com indivíduos sem DAC. E ainda, observaram que seu nível de expressão foi inversamente associado com a IL-6 e o escore de Gensini e

positivamente associado com a IL-10. Essas recém descobertas sugerem, portanto, que ao contrário do que se pensava, o miRNA-16 pode ser um miRNA antiaterogênico⁹⁶.

Modelos experimentais de IAM através de ligadura da artéria coronária descendente anterior em ratas demonstrou que o tratamento com atenolol, metoprolol⁹⁷ e carvedilol⁹⁸, agentes antagonistas de receptores beta-adrenérgicos (betabloqueadores), após o IAM reduziu a apoptose de cardiomiócitos em áreas infartadas/cicatrizadas, bordas e não infartadas, e os autores sugerem que isto ocorreu, principalmente, pelo aumento da razão Bcl-2/Bax avaliada por *western blotting*. Em relação aos pacientes com DAC envolvidos no nosso estudo, dos vinte e dois participantes, dezenove (86%) faziam uso de betabloqueadores. Sendo assim, a partir destes dados experimentais poderíamos sugerir que estes agentes farmacológicos mandatórios nas DCV, principalmente após IAM, por melhorar o prognóstico e reduzir mortalidade⁹⁹, podem estar contribuindo para a diminuição da cascata de apoptose por aumentar o fator de sobrevivência celular Bcl-2.

Outro achado interessante no presente estudo foi que observamos que a expressão proteica da Bad, fator antiangiogênico, que regula diretamente a ativação do fator de sobrevivência Bcl-2, está aumentada nos pacientes com DAC. A literatura mostra que a Akt tem influência direta no fator Bad⁴⁰. No nosso estudo, a expressão proteica da Akt fosforilada mostrou forte tendência ($p= 0,06$) em estar diminuída nos pacientes com DAC, desta maneira reforçando que estas vias estão interligadas.

Outro fator importante na sinalização para a angiogênese, o PI3K, regulado diretamente pela PI3KR2, não foi diferente entre os grupos DAC e CS. Com isso, pudemos observar que a influência dos angiomiRs envolvidos na regulação negativa dos fatores da cascata de sinalização para angiogênese, determinou pelo menos em parte, algumas alterações observadas neste trabalho. Enquanto que outras modulações esperadas dos miRNAs nos seus alvos, impactando diretamente nas expressões proteicas, não foram observadas neste estudo.

Não podemos esquecer que a expressão tecido-específico é uma característica importante dos miRNAs^{100,101}. Os diferentes perfis de expressão em diferentes locais, como sangue e tecido, indicam que as funções fisiológicas dos miRNAs podem ser diferentes. A avaliação da expressão de miRNAs específicos no sangue e no tecido esquelético de pacientes com DAC, identificando a participação na regulação de funções fisiológicas pode ser importante para estudos futuros. Para pontuar o que foi exposto acima, dois estudos mostraram efeitos diferentes do miRNA-21 de acordo com a célula estudada. Em células de glioblastoma o miRNA-21 teve efeito antiapoptótico¹⁰². Por outro lado, o efeito antiapoptótico não foi encontrado em estudo com células HeLa¹⁰³. Estes achados reforçam o entendimento de que a função fisiológica dos miRNAs pode ser tipo-celular dependente.

Em nosso estudo não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão do miRNA-92a entre os pacientes com DAC e indivíduos saudáveis. Assim como o miRNA-21, a expressão do miRNA-92a é controversa na literatura. De acordo com a literatura prévia^{74,77,104-106}, parece que o estímulo

para aumento ou diminuição do miRNA-92a está intimamente ligado a regiões com disfunção endotelial, em bifurcações com placas de ateroma e inflamação. Nossos pacientes não apresentaram aumento do *shear retrógrado* e nem do *shear oscilatório*, que estão ligados a um fluxo oscilatório (turbilhonado). Uma possível explicação para esses achados é que todos os pacientes avaliados em nosso estudo (100%) faziam uso de estatina, medicação que tem efeito pleiotrópico, ajudando não só na redução direta do colesterol total e LDL, mas também auxiliando no controle inflamatório vascular através da modulação do fator de transcrição KLF¹⁰⁷⁻¹¹⁰. Desta forma, o aumento da expressão de KLF impactaria na sinalização para o aumento da eNOS e assim na biodisponibilidade de NO.

A expressão proteica da eNOS não foi diferente entre os grupos estudados. Para este achado, podemos especular que um balanço entre dois fatores que impactam direto na expressão da eNOS, PTEN e KLF2, foram afetados pela expressão diminuída dos miRNAs -21 e -92a teciduais. A expressão de miRNA-92a não foi significativamente diferente, entretanto tendeu ($p=0,07$) para estar diminuído na DAC em comparação ao CS. O PTEN é reconhecido como supressor de vias^{70,73,91} e quando aumentado diminuiria a expressão de eNOS, enquanto que KLF2 é um fator de transcrição que ativaria a eNOS¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Para a nossa surpresa, a expressão gênica de iNOS, fator importante para a via inflamatória que contribui, juntamente com os fatores antiangiogênicos da via do VEGF, para a diminuição da integridade vascular e manutenção da disfunção endotelial, estava reduzido nos pacientes com DAC quando comparados aos indivíduos do grupo CS. Porém, o mesmo não foi

observado para a expressão proteica, onde não observamos diferenças entre os grupos. Poderíamos especular que uma diminuição da expressão gênica da iNOS poderia mostrar que os nossos pacientes com DAC não estão com uma sinalização ativa de uma das vias inflamatórias, o que pode ter sido influenciado pelas medicações em uso, principalmente as estatinas. Ainda, a expressão da ERK1/2 fosforilada estava diminuída no grupo DAC em relação ao grupo CS. Entretanto, observamos que a expressão proteica da Raf, um fator inicial da cadeia de sinalização para ativação da ERK1/2, foi semelhante entre os grupos DAC e CS. A ERK1/2 é via final da cascata de sinalização para a proliferação celular, muito importante no processo de angiogênese. Porém, isto demonstra, pelo menos em parte, nesta via, uma sinalização reduzida, podendo alterar a formação de novos vasos, capilarização e até ter impacto, talvez, no fluxo sanguíneo.

Avaliação adicional da expressão gênica e proteica de HIF-1 α , fator de transcrição ativado por hipóxia, e importante sinalização para a angiogênese, não foi diferente entre os grupos DAC e CS, demonstrando que estes pacientes não tinham essa via exacerbada.

Existem algumas explicações para achados controversos na literatura em relação a expressão de miRNAs e seus genes-alvo. Nós avaliamos amostras de sangue total e do tecido muscular esquelético, enquanto outros estudos utilizaram o plasma e células de cultura. Quando analisamos as amostras de sangue total, mensuramos os miRNAs a partir dos níveis intracelulares e extracelulares. Porém, estudos anteriores mediram no plasma, olhando apenas para miRNAs em nível extracelular¹¹¹. Outros desafios na

medida da expressão de miRNAs circulantes podem ser explicados por alguns fatores como: diferentes tipos de controles endógenos ou exógenos usados para normalizar o miRNA, os métodos usados para coleta, preparação e armazenamento das amostras, características do paciente, como por exemplo, idade, sexo, histórico médico, bem como o tempo e a gravidade da doença. Em conjunto ou isoladamente, estes fatores citados podem resultar na variabilidade dos níveis de miRNA encontrados nos estudos^{106,111}.

6.2 Fluxo sanguíneo periférico

No presente estudo, o grupo DAC apresentou menores valores de *SR* anterógrado e *SR* médio do que o grupo CS. Estes fluxos representam um padrão de fluxo laminar, associado à expressão de genes antiaterogênicos¹², sendo importante modulador da função vascular, podendo ainda estar associado a maior biodisponibilidade de NO. Assim, em nosso estudo que avaliou pacientes com DAC, que conhecidamente apresentam disfunção vascular, este achado é esperado. No entanto, observamos que o *SR* retrógrado e *SR* oscilatório, ambos relacionados a um distúrbio no padrão de fluxo (fluxo turbilhonado), foram semelhantes entre os pacientes com DAC e os indivíduos CS. Sabe-se que este padrão de fluxo está diretamente relacionado com a saúde cardiovascular. Estudo prévio, *in vitro*, observou que este perfil de fluxo turbilhonado está associado ao aumento na expressão de genes pró-aterogênicos e inflamatórios (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 e NADPH oxidase) e à diminuição da expressão de eNOS e, conseqüentemente, da biodisponibilidade de NO¹¹². Além disso, em indivíduos saudáveis¹¹³, o aumento agudo e crônico

do fluxo retrógrado pode levar a uma diminuição marcante na função endotélio-dependente tanto de artérias de membros superiores e inferiores.

Nós não medimos os níveis de NO nos nossos pacientes, mas está bem estabelecido na literatura que a sua biodisponibilidade está reduzida na presença de DCV^{11,14,114-117}. No nosso estudo, não observamos alterações na expressão gênica e proteica da eNOS e nem aumento do fluxo retrógrado nos pacientes com DAC em relação ao CS. Deste modo, podemos pensar que talvez o uso da medicação estatina pelos pacientes com DAC esteja influenciando nas respostas dessa via. A estatina, além de reduzir o colesterol, promove proteção por reduzir fatores inflamatórios e melhorar a função endotelial¹¹⁸⁻¹²². Entretanto, esta proteção contra um possível aumento do fluxo retrógrado vascular, não foi suficiente para proteger contra a redução do fluxo sanguíneo muscular visto nestes pacientes.

Em relação as medidas durante os protocolos experimentais de exercício de *handgrip* e de exercício de *perna*, observamos diferenças significativas na resposta do FSM e CVA entre pacientes com DAC e o grupo CS, em que o grupo DAC apresentou menor resposta vasodilatadora durante o exercício. Os achados do presente estudo corroboram com dados prévios do nosso grupo¹²³, onde observamos comportamento semelhante em pacientes 1 mês após o IAM, ou seja, um FSM diminuído em repouso e a ausência de resposta vasodilatadora frente ao exercício. O que nos chama atenção, é que provavelmente este prejuízo na vasodilatação não está ocorrendo somente na fase aguda do evento isquêmico, 1 mês após o IAM, mas está perdurando por um longo período nestes pacientes com DAC crônica. Contudo, apesar deste

conhecimento, o mecanismo por trás deste comportamento ainda não está totalmente elucidado.

Nosso estudo não avaliou nenhum mecanismo envolvido nesta resposta, mas podemos especular que os fatores de risco como hipertensão, dislipidemias, tabagismo e diabetes, presentes nos nossos pacientes com DAC, estão alterando a permeabilidade e funcionalidade do endotélio vascular. A dislipidemia foi o fator de risco mais prevalente, sendo presente em 100% da nossa população com DAC, seguida pela hipertensão com 73%. Juntas, essas condições podem promover um ambiente favorável ao desenvolvimento de disfunção endotelial e de uma resposta vasodilatadora abolida durante o exercício.

Interessantemente, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que mostra associações entre angiomiRs e o FSP em pacientes com DAC. De acordo com nossa hipótese, a expressão dos miRNAs -126, -16, -21 e 92a circulantes e teciduais estaria associada aos fluxos das artérias braquial e femoral, e ao FSM em repouso e durante os exercícios de handgrip e de perna. Contudo, ao contrário da nossa hipótese inicial, não observamos associação entre o padrão de fluxo das artérias braquial e femoral com os miRNAs circulantes. Por outro lado, os miRNAs -126, -16 e -21 circulantes estavam associados à resposta de FSM e CVA, durante o exercício de handgrip, mas não ao exercício de perna. Em relação aos miRNAs teciduais, nós encontramos apenas uma associação do miRNA-16 com o FSM. Estas associações parecem importantes e relevantes quando pensamos que os miRNAs têm a função de regular a expressão proteica. Os miRNAs podem

estar modulando a integridade vascular pelo fluxo sanguíneo, pois os miRNAs possuem múltiplos alvos no endotélio. Quando o miRNA atua em algum gene-alvo, espera-se uma diminuição na produção de proteínas e consequentemente, uma redução na atividade de várias vias. Estes resultados, até onde sabemos, são novos na literatura e mostram que estes miRNAs teciduais podem ter um papel protetor nestes pacientes com DAC, sendo associados ao fluxo sanguíneo muscular. No entanto, mais estudos mecanicistas são necessários para endossar estes achados.

Conclusões

7-CONCLUSÕES

Pacientes com DAC em relação aos indivíduos CS apresentaram:

- 1- Menor expressão dos miRNAs -126, -16 e -21 tanto circulantes quanto teciduais;
- 2- Maior expressão gênica do PI3KR2 e menor de Bcl-2 e iNOS;
- 3- Maiores expressões proteicas de VEGFR-2, Bad e Bcl-2, e menor expressão de pERK1/2/ERK1/2;
- 4- Menor resposta vasodilatadora durante o exercício de *handgrip* a 30%CVM;
- 5- Menor *shear rate* anterógrado e médio nas artérias braquial e femoral em repouso.

Além disso, foi observada uma associação positiva entre o t-miRNA-126 e PI3KR2, e entre o t-miRNA-16 e o VEGFR-2. Ainda, associações entre os c-miRNAs-126, -16 e -21 com o FSM e CVA em repouso e durante o exercício, e associação entre o t-miRNA-16 com o FSM em repouso.

Os resultados do presente estudo demonstram que alguns angiomiRs circulantes e teciduais envolvidos na via do VEGF estão alterados na DAC, o que tem influência direta nos genes-alvo impactando no processo de angiogênese, ativação de via apoptótica e de síntese proteica.

Ainda, de relevância, nosso estudo mostrou algumas associações entre os angiomiRs e os fatores angiogênicos, fatores antiangiogênicos e FSP, sugerindo dessa maneira, a influência desses miRNAs na modulação da função vascular.

Limitações

8-LIMITAÇÕES

Uma possível limitação do nosso estudo está relacionada à dificuldade de padronizar o tipo de controle endógeno (normalizador) para os miRNAs circulantes, dificultando a comparação entre os resultados de diferentes grupos de pesquisa. Contudo, essa é uma dificuldade geral de diversos laboratórios e não específica do presente estudo.

Perspectivas

9-PERSPECTIVAS

O tratamento da DAC avançou muito nos últimos anos melhorando a qualidade de vida e prognóstico dos pacientes. Entretanto, o controle dos fatores de risco para as DCV, principalmente para a doença aterosclerótica, bem como a manutenção de um endotélio vascular saudável ainda é um desafio. Neste cenário, o estudo dos miRNAs e suas implicações no sistema cardiovascular irão contribuir para tratamento e prevenção da doença. Os resultados desse trabalho trazem novos conhecimentos sobre a importante participação dos miRNAs na angiogênese vascular e sua possível influência na modulação do fluxo sanguíneo muscular.

Desta forma, o estudo de perfis de miRNAs envolvidos especificamente na angiogênese, tanto circulantes quanto teciduais, abre perspectiva para trabalhos futuros com a utilização de miRNAs como biomarcadores de gravidade da doença e também como possíveis agentes terapêuticos utilizando modelos de silenciamento ou de *overexpression* (superexpressão).

10-ANEXO

Anexo A - Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

PROJETO DE PESQUISA

Título: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NO CONTROLE QUIMIORREFLEXO DA ATIVIDADE NERVOUSA SIMPÁTICA EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA COM E SEM APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO

Pesquisador Responsável: Maria Urbana Pinto Brandão Rondon

Versão: 2

Pesquisador Executante: Carlos Alcino do Nascimento Filho **CAAE:** 24057913.2.0000.0068

Co-autores: Carlos Eduardo Negrão, Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, Geraldo Lorenzi Filho, Ivani Credidio Trombetta, Luiz Antônio Machado César, Edgar Toschi Dias, Edilamar Menezes de Oliveira, Tiago Fernandes, Larissa Ferreira dos Santos

Instituição: HCFMUSP

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11414

Número do Parecer: 1.402.614

Data da Relatoria: 03/02/2016

Apresentação do Projeto: Trata-se de dois subprojetos de um temático da Profa Urbana Rondon. Este objetiva doutorado PG senso estrito. Será desenvolvido no InCor e coparticipação da Faculdade de Educação Física da USP. Título: EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NO CONTROLE QUIMIORREFLEXO DA ATIVIDADE NERVOUSA SIMPÁTICA EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA COM E SEM APNEIA OBSTRUTIVA DO SONO.

Objetivo da Pesquisa: Objetivo Primário: Estudar o controle quimiorreflexo da atividade nervosa simpática, o estresse oxidativo e os mecanismos envolvidos na angiogênese e função endotelial em pacientes com DAC e AOS. Objetivo Secundário: Pretendemos estudar o efeito do treinamento físico no controle autonômico, vascular e hemodinâmico, nos pacientes com DAC e AOS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos: 1.Avaliação Laboratorial: Mínimo, durante a coleta do sangue, alguns pacientes podem sentir ligeira dor com a picada da agulha e após a coleta, raramente pequeno hematoma pode aparecer em algumas pessoas. 2.Avaliação da Apneia Obstrutiva do Sono: Não há nenhum risco para sua saúde. 3.Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial (MAPA): Não há nenhum risco para sua saúde.4.Avaliação da Capacidade Funcional: Mínimo. Por ser um teste máximo, o paciente estará sujeito aos riscos que toda pessoa tem quando se faz um esforço, como o aumento exacerbado da pressão arterial, arritmias ou isquemias. Porém, o exame será conduzido por um médico cardiologista e se ele observar qualquer alteração que envolva qualquer risco maior para o paciente, o teste será interrompido.5.Avaliação da Atividade Nervosa Simpática Muscular: Baixo, o paciente poderá sentir leve dor ou leve choque ao tocar o local onde foram colocadas as agulhas ou até um pouco de fraqueza muscular durante as duas primeiras semanas. Raramente (1 em cada 600 ou mais casos) essa sensibilidade pode ser prolongada por até 3 meses. 6.Avaliação do fluxo sanguíneo muscular: Não há nenhum risco para sua saúde. 7.Avaliação da Pressão Arterial, Frequência Cardíaca e Frequência Respiratória: Não há nenhum risco para sua saúde. 8.Avaliação do Controle Quimiorreflexo Periférico e Central: Mínimo. Durante o protocolo experimental, o paciente poderá sentir certa secura na boca, raras vezes poderá sentir alguma tontura, taquicardia ou cansaço pelo exercício realizado. Porém, o exame será conduzido com presença um médico cardiologista e se ele observar qualquer alteração que envolva qualquer risco maior para o paciente, o teste será interrompido. 9.Avaliação da Função Cardíaca (Ecocardiograma com ζ Doppler ζ): Não há nenhum risco para sua saúde. 10.Avaliação de Fluxo,

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Resistência, Espessura e Luz da Artéria Carótida: Não há nenhum risco para sua saúde. 11. Biópsia do Músculo Esquelético: Baixo. A assepsia e anestesia do local será feita durante o procedimento para se evitar infecção. Contudo, embora nunca tenha acontecido, há uma baixa chance de ocorrer infecção localizada. Existe, também, uma possibilidade mínima de ficar uma pequena cicatriz no local. Esse procedimento será executado por um médico devidamente treinado nesta técnica. 12. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, pressão arterial, atividade nervosa simpática muscular: Não há nenhum risco para sua saúde. 13. Controle barorreflexo espontâneo: Não há nenhum risco para sua saúde. 14. Avaliação da Qualidade de vida: Não há nenhum risco para sua saúde. 15. Protocolo de Treinamento Físico: Mínimo. Por estar realizando exercício, mesmo em uma intensidade baixa a moderada, pode haver o risco muito baixo de ocorrer arritmias, isquemia do coração, infarto do miocárdio ou lesões musculares. Contudo, em todas as sessões de treinamento físico haverá um médico cardiologista de plantão na Unidade para o atendimento a qualquer emergência que ocorra. Benefícios: Para os participantes, todos realizarão uma avaliação clínica e cardiovascular e terão acesso aos seus resultados. Para aqueles sorteados para realizarem o programa de treinamento físico regular, supervisionado proposto, estes deverão sentir melhora na sua condição física e mais disposição. Para os pesquisadores, o estudo permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle neurovascular e dos efeitos do treinamento físico na doença arterial coronariana.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto é descrito detalhadamente e é relevante. Estudo randomizado, ensaio clínico, duplo cego. Tem aprovação da Comissão Científica do InCor datado de outubro de 2013. Já apresenta relatório parcial de out 2015 com recebimento do material e recrutamento de 3 pacientes sendo que somente 1 pode fazer os exames. Foi submetido a CAPPesq em dez 2015. A pesquisadora solicita a inclusão do subprojetos: A) Controle quimiorreflexo da atividade nervosa simpática em pacientes com

doença arterial coronariana com e sem apneia obstrutiva do sono, que será tese de doutorado
B) Influência dos microRNAs nos fatores angiogênicos e anti-angiogênicos na via do fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com doença arterial coronariana, que será tese de doutorado da aluna LARISSA FERREIRA DOS SANTOS ambos sob a orientação da Profa. Dra. Maria Urbana Pinto Brandão Rondon.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: TCLE, folha de rosto, cadastro on line, termos de anuência, orçamento eticamente escritos. Será feita biópsia de músculo que será guardada em banco para posteriores análises não pertencentes a este subprojeto. Não consta responsabilidade ou termos em relação a este biobanco.

Recomendações: Peço esclarecimento sobre: - Biobanco: responsabilidade, formulários.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado com recomendação.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

São Paulo, 03 de Fevereiro de 2016

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO

15/02/2016

Julma Lucia

Alfredo José Mansur

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Referências

11-REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. [homepage na internet]. NCD mortality and morbidity. [acesso em 04 maio 2020]. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/
2. Ministério da Saúde do Brasil [homepage na internet]. Análise de Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis, Secretária de Vigilância em Saúde [acesso em 31 agosto 2020]. Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/dantps/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/mortalidade/dcnt/>
3. Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
4. Weissberg P. Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. *Atherosclerosis*. 1999;147 Suppl 1:S3-10.
5. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
6. Gimbrone Jr MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
7. Tousoulis D, Kampoli AM, Papageorgiou N, Androulakis E, Antoniadou C, Toutouzias K, Stefanadis C. Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. *Curr Pharm Des*. 2011;17(37):4089-110.
8. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(5):546-9.

9. Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Exercise and the coronary circulation- alterations and adaptations in coronary artery disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2006;48(4):270-84.
10. Smart Servier Medical Art. [homepage na internet]. Free medical images. [acesso em 29 maio 2020]. Disponível em: <https://smart.servier.com/>
11. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
12. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):677-85.
13. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989;13(6 Pt 2):658-67.
14. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22 Suppl 4:S1-14.
15. Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 1998;98(24):2709-15.
16. Antunes-Correa LM, Melo RC, Nobre TS, Ueno LM, Franco FG, Braga AM, Rondon MU, Brum PC, Barretto AC, Middlekauff HR, Negrao CE. Impact of gender on benefits of exercise training on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2010;12(1):58-65.

17. Soares-Miranda L, Franco FG, Roveda F, Martinez DG, Rondon MU, Mota J, Brum PC, Antunes-Correa LM, Nobre TS, Barretto AC, Middlekauff HR, Negrao CE. Effects of exercise training on neurovascular responses during handgrip exercise in heart failure patients. *Int J Cardiol.* 2011;146(1):122-5.
18. Martinez DG, Nicolau JC, Lage RL, Trombetta IC, de Matos LD, Laterza MC, Negrão CE, Rondon MU. Abnormal muscle vascular responses during exercise in myocardial infarction patients. *Int J Cardiol.* 2013;165(1):210-2.
19. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol (1985).* 2004;97(3):1119-28.
20. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-60.
21. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
22. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4220-6.
23. Daher Z, Boulay PL, Desjardins F, Gratton JP, Claing A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24591-9.

24. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990;5(4):519-24.
25. Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72(6):835-46.
26. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*. 2000;19(17):2138-46.
27. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999 Jan;13(1):9-22.
28. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
29. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62-6.
30. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*. 1999;126(13):3015-25.

31. Chung NA, Lydakis C, Belgore F, Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis, thrombogenesis, endothelial dysfunction and angiographic severity of coronary artery disease. *Heart*. 2003;89(12):1411-5.
32. Ramos C, Napoleão P, Selas M, Freixo C, Viegas Crespo AM, Mota Carmo M, Cruz Ferreira R, Pinheiro T. Prognostic value of VEGF in patients submitted to percutaneous coronary intervention. *Dis Markers*. 2014;2014:135357.
33. Alber HF, Frick M, Dulak J, Dörler J, Zwick RH, Dichtl W, Pachinger O, Weidinger F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma concentrations in coronary artery disease. *Heart*. 2005;91(3):365-6.
34. Cotton JM, Mathur A, Hong Y, Brown AS, Martin JF, Erusalimsky JD. "Acute rise of circulating vascular endothelial growth factor-A in patients with coronary artery disease following cardiothoracic surgery," *European Heart Journal*. 2002; 23(12)953–959.
35. Korybalska K, Pyda M, Kawka E, Grajek S, Breborowicz A, Witowski J, "Interpretation of elevated serum VEGF concentrations in patients with myocardial infarction," *Cytokine*. 2011;54(1):74–78.
36. Kranz A, Rau C, Kochs M, Waltenberger J, "Elevation of vascular endothelial growth factor A serum levels following acute myocardial infarction. Evidence for its origin and functional significance," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32(1):65–72.
37. Kim S-Y, Lee S-H, S. Park S, Kang S-M, Chung N, ShimW-H, et al. "Vascular endothelial growth factor, soluble Fms-like tyrosine kinase 1,

- and the severity of coronary artery disease," *Angiology*. 2011;62(2):176-83.
38. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol*. 2003;39(11):615-47.
 39. Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*. 1999 Dec;1(8):E209-16.
 40. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996;87(4):619-28.
 41. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol*. 1999;154(2):375-84.
 42. Narula J, Haider N, Virmani R et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *New Engl J Med*. 1996;335:1182–1189.
 43. Olivetti G, Abbi R, Quaini F et al. Apoptosis in the failing human heart. *New Engl J Med*. 1997;336:1131–1141.
 44. Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, Zalba G, Diez J. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension. Mechanisms and potential management. *Hypertension*. 2001;38:1406–1412.
 45. Suárez Y, Sessa WC. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. *Circ Res*. 2009;104(4):442-54.

46. Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*. 2012; 59(2):513-20.
47. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(2):261-71.
48. da Silva Jr ND, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, DE Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(8):1453-62.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
50. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):522-31. doi: 10.1038/nrg1379.
51. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
52. Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*. 2011;12(4):221.
53. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. 2010 Mar;222(3):540-5.

54. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85.
55. BioRender. [homepage na internet]. Create Professional Science. Figures in minutes. [acesso em 29 maio 2020]. Disponível em: <https://biorender.com/>
56. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 2018;47:D155–D162.
57. Hartmann D, Thum T. MicroRNAs and vascular (dys)function. *Vascul Pharmacol.* 2011;55(4):92-105.
58. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010;107(5):677-84.
59. Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405(1):42-6.
60. Fish JE, Santoro MM, Morton SU. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell.* 2008;15(2): 272–84.
61. Zhang J, Zhang Z, Zhang DY, Zhu J, Zhang T, Wang C. microRNA 126 inhibits the transition of endothelial progenitor cells to mesenchymal cells via the PIK3R2-PI3K/Akt signalling pathway. *PLoS One.* 2013;8(12):e83294.

62. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signaling. *Nature*. 2001;412(6847):647–51.
63. Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Kein J, Asano T et al. Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48453–66.
64. Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty KE, Lawson ND. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signaling during angiogenesis. *Nature*. 2010;464(7292):1196–200.
65. Goretti E, Rolland-Turner M, Léonard F, Zhang L, Wagner DR, Devaux Y. MicroRNA-16 affects key functions of human endothelial progenitor cells. *J Leukoc Biol*. 2013;93(5):645-55.
66. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79(4):581-8.
67. Quintavalle C, Garofalo M, Croce CM, Condorelli G. "ApoptomiRs" in vascular cells: their role in physiological and pathological angiogenesis. *Vascul Pharmacol*. 2011 Oct;55(4):87-91.
68. Sen CK, Gordillo GM, Khanna S, Roy S. Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *J Vasc Res*. 2009;46(6):527-40.
69. Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug

- temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res.* 2010;1352:255-64.
70. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2007;100(11):1579-88.
71. Han H, Qu G, Han C, Wang Y, Sun T, Li F, Wang J, Luo S. MiR-34a, miR-21 and miR-23a as potential biomarkers for coronary artery disease: a pilot microarray study and confirmation in a 32-patient cohort. *Exp Mol Med.* 2015;47:e138.
72. Boon RA, Hergenreider E, Dimmeler S. Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs. *Thromb Haemost.* 2012;108(4):616-20.
73. Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393(4):643-8.
74. Wu W, Xiao H, Laguna-Fernandez A, et al. Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation.* 2011;124: 633–641.
75. Loyer X, Potteaux S, Vion AC, Guérin CL, Boulkroun S, Rautou PE, et al. Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res.* 2014 Jan 31;114(3):434-43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302213.

76. Zhou J, Wang KC, Wu W, et al. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferatorsactivated receptor-alpha in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:10355–10360.
77. Liu F, Li R, Zhang Y, Qiu J, Ling W. Association of plasma MiR-17-92 with dyslipidemia in patients with coronary artery disease. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(23):e98.
78. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, Carnuta MG, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable Coronary Artery Disease Patients. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140958.
79. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2528–H2538.
80. Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. Inhibition of capillary growth in chronically stimulated rat muscles by NG-nitroL-arginine, nitric oxide synthase inhibitor. *Microvasc Res*. 2000;59: 45–51.
81. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*. 1992;72: 369–417.
82. Barretto AC, Santos AC, Munhoz R, Rondon MU, Franco FG, Trombetta IC, Roveda F, de Matos LN, Braga AM, Middlekauff HR, Negrão CE. Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2009;135(3):302-7.

83. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ; Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440-63.
84. Padilla J, Simmons GH, Fadel PJ, Laughlin MH, Joyner MJ, Casey DP. Impact of aging on conduit artery retrograde and oscillatory shear at rest and during exercise: role of nitric oxide. *Hypertension*. 2011 Mar;57(3):484-9.
85. Negrão CE, Rondon MU, Tinucci T. Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;208:H1286-92.
86. Ferreira-Santos L, Martinez DG, Nicolau JC, Moreira HG, Alves MJ, Pereira AC, et al. Neurovascular control during exercise in acute coronary syndrome patients with Gln27Glu polymorphism of β 2-adrenergic receptor. *PLoS One*. 2017 Feb 24;12(2):e0173061.
87. Da Silva Jr ND, Roseguini BT, Chehuen M, Fernandes T, Mota GF, Martin PK, Han SW, Forjaz CL, Wolosker N, de Oliveira EM. Effects

- of oral N-acetylcysteine on walking capacity, leg reactive hyperemia, and inflammatory and angiogenic mediators in patients with intermittent claudication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(5):H897-905.
88. Antunes-Correa LM, Nobre TS, Groehs RV, Alves MJ, Fernandes T, Couto GK, et al. Molecular basis for the improvement in muscle metaboreflex and mechanoreflex control in exercise-trained humans with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307(11):H1655-66.
89. Silveira AC, Fernandes T, Soci ÚPR, Gomes JLP, Barretti DL, Mota GGF, Negrão CE, Oliveira EM. Exercise Training Restores Cardiac MicroRNA-1 and MicroRNA-29c to Nonpathological Levels in Obese Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1549014.
90. Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, et al. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(6):e001249.
91. Church JE, Qian J, Kumar S, Black SM, Venema RC, Papapetropoulos A, et al. Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase by The Lipid Phosphatase Pten. *Vascul Pharmacol*. 2010;52(5-6):191–198.
92. Chamorro-Jorganes A, Araldi E, Penalva LOF, Sandhu D, Fernández-Hernando C, Suárez Y. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2595-606.

93. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(39):13944-9.
94. Spinetti G, Fortunato O, Caporali A, Shantikumar S, Marchetti M, Meloni M, et al. MicroRNA-15a and microRNA-16 impair human circulating proangiogenic cell functions and are increased in the proangiogenic cells and serum of patients with critical limb ischemia. *Circ Res*. 2013;112(2):335-46.
95. O'Sullivan JF, Neylon A, McGorrian C, Blake GJ. miRNA-93-5p and other miRNAs as predictors of coronary artery disease and STEMI. *Int J Cardiol*. 2016;224:310-316.
96. Wang M, Li J, Cai J, Cheng L, Wang X, Xu P. Overexpression of MicroRNA-16 Alleviates Atherosclerosis by Inhibition of Inflammatory Pathways. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8504238.
97. Chen YF, Yang YJ, Ruan YM, Sun CR, Tian Y, Zhou YW, et al. Effects of atenolol and metoprolol on cardiomyocyte apoptosis and related gene expression after acute myocardial infarction in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2006;28(4):538-43.
98. Yang YJ, Chen YF, Ruan YM, Chen X, Zhang HD, Tian Y, et al. Beneficial effects of carvedilol on cardiomyocyte apoptosis and bcl-2/bax expression after acute myocardial infarction an experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86(13):919-22.
99. Chen Y, Tang XF, Gao RL, Yang YJ, Xu B, Yuan JQ. Association of β -Blocker Therapy at Discharge with Clinical Outcomes after Acute Coronary

Syndrome in Patients without Heart Failure. *Cardiovasc Ther.* 2020;2020:4351469.

100. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12:735–739.
101. Babak T, Zhang W, Morris Q, Blencowe BJ, Hughes TR. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA.* 2004;10(11):1813-9. doi: 10.1261/rna.7119904.
102. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005;65:6029–6033.
103. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:1290 –1297
104. Fang Y, Davies PF. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Apr;32(4):979-87.
105. Wang Z, Zhang J, Zhang S, Yan S, Wang Z, Wang C, Zhang X. MiR-30e and miR-92a are related to atherosclerosis by targeting ABCA1. *Mol Med Rep.* 2019;19(4):3298-3304.
106. Liu Y, Li Q, Hosen MR, Zietzer A, Flender A, Levermann P, et al. Atherosclerotic Conditions Promote the Packaging of Functional MicroRNA-92a-3p Into Endothelial Microvesicles. *Circ Res.* 2019;124(4):575-587.

107. Sen-Banerjee S, Mir S, Lin Z, Hamik A, G Atkins B, Das H, et al. Kruppel-like factor 2 as a novel mediator of statin effects in endothelial cells. *Circulation*. 2005;112(5):720-6.
108. Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone Jr MA, García-Cardena G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem*. 2005;280(29):26714-9.
109. Bu D-X, Tarrio B, Grabie N, Zhang Y, Yamazaki H, Stavrakis G, et al. Statin-induced Krüppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory and pathogenic responses. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1961-70.
110. Villarreal Jr G, Zhang Y, Larman HB, Gracia-Sancho J, Koo A, García-Cardena G. Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):984-9.
111. Weber M, Baker MB, Patel RS, Quyyumi AA, Bao G, Searles CD. MicroRNA Expression Profile in CAD Patients and the Impact of ACEI/ARB. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:532915.
112. Young CN, Deo SH, Padilla J, Laughlin MH, Fadel PJ. Pro-atherogenic shear rate patterns in the femoral artery of healthy older adults. *Atherosclerosis*. 2010;211(2):390-2.
113. Thijssen DH, Schreuder TH, Newcomer SW, Laughlin MH, Hopman MT, Green DJ. Impact of 2-Weeks Continuous Increase in Retrograde Shear Stress on Brachial Artery Vasomotor Function in Young and Older Men. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(10):e001968.

114. Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg.* 2006;61(6):326-34.
115. Fernandes T, Gomes-Gatto CV, Pereira NP, Alayafi YR, das Neves VJ, Oliveira EM. NO Signaling in the Cardiovascular System and Exercise. (Chapter 13). In: J. Xiao (ed.), *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment, Advances in Experimental Medicine and Biology.* © Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017.
116. Lundberg JO, Gladwin MT, Weitzberg E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(9):623-41.
117. Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(5):292-316.
118. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation.* 1999;99(25):3227-33.
119. Cohen JD, Drury JH, Ostdiek J, Finn J, Babu BR, Flaker G, et al. Benefits of lipid lowering on vascular reactivity in patients with coronary artery disease and average cholesterol levels: a mechanism for reducing clinical events? *Am Heart J.* 2000;139(4):734-8.
120. Dupuis J, Tardif JC, Rouleau JL, Ricci J, Arnold M, Lonn E, et al. Intensity of lipid lowering with statins and brachial artery vascular endothelium reactivity after acute coronary syndromes (from the BRAVER trial). *Am J Cardiol.* 2005;96(9):1207-13.

121. Alber HF, Frick M, Süssenbacher A, Dörler J, Dichtl W, Stocker EM, et al. Effect of atorvastatin on peripheral endothelial function and systemic inflammatory markers in patients with stable coronary artery disease. *Wien Med Wochenschr.* 2007;157(3-4):73-8.
122. Hoshiga M, Arishiro K, Nakakoji T, Miyazaki N, Negoro N, Okabe T, et al. Switching to aggressive statin improves vascular endothelial function in patients with stable coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(7):705-11.
123. Martinez DG, Nicolau JC, Lage RL, Toschi-Dias E, de Matos LDNJ, Alves MJNN, et al. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. *Hypertension.* 2011;58(6):1049-56.