

NATAN DANIEL DA SILVA JUNIOR

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs CIRCULANTES APÓS UMA SESSÃO
AGUDA DE EXERCÍCIO EM INDIVÍDUOS COM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA:
PAPEL DA N-ACETILCISTEÍNA**

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Prof^a Dr^a Edilamar
Menezes de Oliveira

São Paulo

2016

NATAN DANIEL DA SILVA JUNIOR

Perfil de expressão de micrornas circulantes após uma sessão aguda de exercício em indivíduos com doença arterial periférica: papel da n-acetilcisteína

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

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Prof^a Dr^a Edilamar
Menezes de Oliveira

SÃO PAULO

2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais essa conquista e por tudo que tem feito na minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, por ter aberto a porta do seu Laboratório e por proporcionar a oportunidade de trabalhar com ela durante todos esses anos, além da confiança depositada em mim, pela amizade e compreensão.

Aos meus pais Natan e Eleci, pelo carinho, amor, educação e paciência que tiveram comigo durante toda a vida.

Pela minha esposa Leticia, pelo incentivo, amor, companheirismo, paciência e apoio incondicional que me deu nessa jornada.

Aos meus amigos e técnicos do Laboratório, pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar na realização deste trabalho.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Junior, Natan Daniel da

Perfil da expressão de microRNAs circulantes após uma sessão aguda de exercício em indivíduos com doença arterial periférica : papel da N-acetilcisteína / Natan Daniel da Silva Junior. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Exercício 2.MicroRNAs 3.Moduladores da angiogênese
4.Antioxidantes 5.Estresse oxidativo 6.Inflamação

USP/FM/DBD-190/16

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1 Doença arterial periférica.....	7
3.2 Estresse oxidativo e ação antioxidante.....	10
3.3 Estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e função endotelial em pacientes com doença arterial periférica.....	13
3.4 MicroRNAs: conceitos, biogênese e função.....	18
3.5 MicroRNAs circulantes.....	22
3.6 MicroRNAs: participação em processos angiogênicos, isquêmicos, inflamação e na doença arterial periférica.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Amostra.....	31
4.2 Avaliação clínica.....	32
4.3 Diagnóstico da doença arterial periférica.....	32
4.4 Diagnóstico de obesidade.....	33
4.5 Medida da pressão arterial.....	34
4.6 Administração de NAC/Placebo.....	34
4.7 Protocolo experimental.....	35
4.8 Técnicas e medidas.....	38
4.8.1 Teste progressivo máximo.....	38
4.8.2 Índice tornozelo-braquial.....	38
4.8.3 Fluxo sanguíneo basal e primeira onda do fluxo após a hiperemia reativa à isquemia.....	39
4.9 Análises moleculares e bioquímicas.....	40
4.9.1 Extração de RNA.....	40
4.9.2 Microarray.....	40
4.9.3 Expressão gênica.....	41
4.9.4 Avaliação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo na circulação.....	44
4.10 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Características demográficas.....	47
5.2 Testes de familiarização.....	48
5.3 Impacto do tratamento com NAC no tempo de caminhada na sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	49

5.4	Impacto do tratamento com NAC nas respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar na sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	50
5.5	Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo basal e na hiperemia reativa pico em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	51
5.6	Impacto do tratamento com NAC nos marcadores inflamatórios em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	52
5.7	Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de estresse oxidativo plasmático em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	54
5.8	Microarray de microRNA.....	56
5.8.1	Resultado da expressão diferencial de microRNAs da sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem o uso de NAC.....	56
5.8.2	Resultado da expressão diferencial de microRNAs da sessão aguda de exercício aeróbico máximo com uso de NAC.....	59
5.8.3	Resultado da comparação da expressão diferencial de microRNAs após uma sessão aguda de exercício máximo com e sem uso de NAC.....	62
5.8.4	Estudo de predição <i>in silico</i> dos alvos dos microRNAs que foram alterados pela NAC após a realização do exercício aeróbico máximo.....	65
5.9	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante dos miRNAs selecionados a partir do <i>microarray</i> de microRNAs.....	68
5.10	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante de microRNAs relacionados com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	69
5.11	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante dos alvos do miR-126 relacionados com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	71
5.12	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica sanguínea dos marcadores de angiogênicos em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	73
5.13	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante do alvo do miR-100 relacionado com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	75
5.14	Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante do alvo do miR-92a relacionado com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	76
6.	DISCUSSÃO.....	77
6.1	Impacto do tratamento com NAC no tempo de caminhada.....	77
6.2	Respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar no exercício aeróbico máximo.....	78
6.3	Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	80
6.4	Impacto do tratamento com NAC nos marcadores inflamatórios em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	83

6.5 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de estresse oxidativo plasmático em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	85
6.6 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	88
6.7 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante de microRNAs em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.....	92
6.8 Implicações clínicas.....	97
7. CONCLUSÃO	99
8. REFERÊNCIAS.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com DAP.	47
TABELA 2 - Respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar a sessão aguda de exercício aeróbico máximo	50
TABELA 3 - Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo basal e na hiperemia reativa pico da perna em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo em pacientes com DAP.....	51
TABELA 4 - Vias de sinalização em que os miRNAs -620 e 199b-3p possuem genes-alvos preditos.....	66
TABELA 5 - Estudo de predição <i>in silico</i> dos alvos dos miRNAs que foram alterados pela NAC após a realização do exercício aeróbico máximo.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ação da NAC na enzima glutathiona peroxidase no estresse oxidativo, utilização da glutathiona reduzida como cofator.....	12
FIGURA 2 - Papel central do aumento no estresse oxidativo na fisiopatologia da DAP.....	17
FIGURA 3 - Protocolo experimental.....	37
FIGURA 4 - Tempo de caminhada sem dor e máximo durante os testes de familiarização com o teste incremental em esteira rolante.....	48
FIGURA 5 - Tempo de caminhada até o início da dor e tempo máximo após o tratamento com placebo ou NAC.....	49
FIGURA 6 - Concentração plasmática de MCP-1, sVCAM-1, ET-1 e sICAM-1 no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 5 e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, ($p < 0.05$).....	53
FIGURA 7 - Concentração plasmática da glutathiona representada pela razão entre GSH/GSSG, TBARS (% do repouso placebo) e 8-isoprostano (% do repouso placebo) no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo, e 5 e 30 min após a realização do exercício* diferença vs repouso; † diferença vs Placebo, ($p < 0.05$).....	55
FIGURA 8 - <i>Heatmap</i> dos miRNAs diferentemente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP submetidos a sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem uso de NAC. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log_2 . Diferença significativa com $p < 0,05$	57

- FIGURA 9 - Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP após a sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem uso de NAC. Resultado expresso em Log_2 . * $p < 0,01$ vs repouso.....58
- FIGURA 10 - *Heatmap* dos miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP submetidos a sessão aguda de exercício aeróbico máximo, com uso de NAC. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log_2 . Diferença significativa com $p < 0,05$60
- FIGURA 11 - Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP após a sessão aguda de exercício aeróbico máximo com uso de NAC. Resultado expresso em Log_2 . # $p < 0,01$ vs 1 hora.....61
- FIGURA 12 - *Heatmap* dos miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP, no momento após exercício aeróbico máximo em ambas sessões experimentais. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log_2 . Diferença significativa com $p < 0,05$63
- FIGURA 13 - Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais após a realização do exercício aeróbico máximo. Resultado expresso em Log_2 . * $p < 0,01$ vs sessão experimental com uso de Placebo.....64
- FIGURA 14 - Expressão do miRNA -199b-3p na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a

ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício aeróbico máximo. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.....68

FIGURA 15 - Expressão dos miRNAs -126, -100 e -92a na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício.

* diferença vs repouso; † diferença vs Placebo, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.....70

FIGURA 16 - Expressão dos alvos do miR-126 (PI3KR2 e SPDRE-1) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.....72

FIGURA 17 - Expressão gênica de marcadores angiogênicos (VEGF, eNOS e HIF-1 α) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, † diferença vs Placebo, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.....74

FIGURA 18 - Expressão do alvo do miR-100 (mTOR) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. *diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.....75

FIGURA 19 - Expressão do alvo do miR-192a (ITGA5) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora

após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício.

* diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso

Placebo.....76

FIGURA 20 - Representação esquemática das vias de sinalizações angiogênicas ativadas pelo exercício aeróbico máximo na circulação de pacientes com DAP.....91

FIGURA 21 - Representação esquemática das vias de sinalizações angiogênicas e da regulação dos miRNAs relacionados com angiogênese após o exercício aeróbico máximo na circulação de pacientes com DAP.....97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Sintomas e sinais característicos dos quatro estágios da doença arterial periférica.....9

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AKT - Proteína quinase B

CI – Claudicação intermitente

c-miRNAs - microRNAs circulantes

CAT - Catalase

cDNA – cido desoxirribonucleico complementar

CUL2 - Cullin 2

DAP – Doença arterial periférica

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

ECA - Enzima conversora da angiotensina I

eNOS - Enzima xido nítrico sintase endotelial

ERKs – Quinases de regulação de sinal extracelular

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

EROS - Espécies reativas de oxigênio

ET-1 – Endotelina 1

FAK – Quinase de adesão focal

FC – Frequência cardíaca

FC MAX - Frequência cardíaca máxima

FMD – Dilatação fluxo mediada

GSH - Glutathiona

GSH-Px - Glutathiona peroxidases

GSSG - Glutathiona oxidada

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

HIF-1 - Fator induzido por hipóxia 1

HIF-2 Fator induzido por hipóxia 2

$\text{HO}_2\cdot$ - Radical hidroperoxila

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HUVECS - Células endoteliais de veia umbilical humana

IL-6 – Interleucina - 6

IL-8 – Interleucina - 8

ICAM -1 – Molécula de adesão intercelular

IMC - índice de massa corporal

ITB- Índice tornozelo-braço

ITGA5 - Subunidade $\alpha 5$ da integrina

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

MAPKs – Via de sinalização das MAP quinases

MGP - Mercaptopropionilglicina

MEK- Quinase com dupla especificidade

min - Minutos

miRNAs – microRNAs

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NAC - N-acetilcisteína

NO- Óxido nítrico

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlet

$\text{O}_2\cdot^-$ - Radical Superóxido

OH- Radical hidroxila

PAS - Pressão arterial sistólica

PAD – Pressão arterial diastólica

PCR - Proteína C reativa

PCR em tempo real - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PI3K - Fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato

PI3KR2 - Subunidade regulatória dois da PI3K

PGC-1 α - Proliferador do receptor coativador gama 1-alfa

PPAR - Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

RAF-1 - Proteína treonina quinase

RISC - Complexo de silenciamento induzido de RNA

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

SOD - superóxido dismutase

SPRED-1 - Proteína relacionada a brotamento

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TLRs - Receptores do tipo Toll

TNF-alfa - Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 – Molécula de adesão de célula vascular

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VO₂ – Consumo de oxigênio

VO₂ pico – Consumo de oxigênio no pico do exercício

RESUMO

Silva Junior ND. Perfil de expressão de microRNAs circulantes após uma sessão aguda de exercício em indivíduos com doença arterial periférica: papel da n-acetilcisteína. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: A Doença arterial periférica (DAP) é uma manifestação clínica da aterosclerose, quando esta afeta principalmente as artérias que irrigam os membros inferiores. O exercício aeróbico provoca nos membros afetados pela doença um ciclo de reperfusão-isquemia que desencadeia uma resposta sistêmica aguda caracterizada por aumento do estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. Assim, uma terapia antioxidante pode ser uma terapia alternativa para esses pacientes. Os microRNAs (miRNAs) foram recentemente reconhecidos como reguladores pós-transcricionais, e a identificação desses pode elucidar mecanismos gênicos adicionais pelos quais o exercício é atuante, levando a identificação de genes que são modulados, abrindo perspectivas de abordagens de terapia gênica que podem levar à reversão do quadro da doença arterial periférica. **Objetivo:** Verificar o efeito de uma sessão aguda de exercício aeróbico máxima com e sem uso do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) sobre a expressão de microRNAs e marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo circulantes em pacientes com DAP. **Métodos:** Foram recrutados pacientes com DAP estágio II do Ambulatório da Disciplina de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram submetidos a duas sessões experimentais após a suplementação de NAC ou Placebo. Foi analisado o perfil de expressão de microRNAs circulantes dos indivíduos em repouso e após o exercício máximo, e confirmado a expressão gênica dos miRNAs alterados após o exercício e de seus alvos; e dos níveis plasmáticos de endotelina-1 (ET-1), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, 8-isoprostano e glutatona. **Resultados:** O tratamento com NAC não alterou o

tempo de caminhada, as respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar dos pacientes com DAP. O fluxo sanguíneo em repouso da perna desses pacientes foi maior após a realização do exercício e o tratamento com NAC não alterou essa resposta. Após o exercício houve aumento plasmático de MCP-1, ET-1, VCAM-1 e TBARS, mas o tratamento com NAC não alterou essa resposta. Porém, o tratamento com NAC aumentou os níveis plasmáticos de glutathione durante toda a sessão experimental. Houve alteração da expressão dos c-miRNAs -126, -100 e -92a após a realização do exercício e o tratamento com NAC aboliu essas respostas. Encontramos ainda alteração da expressão gênica circulante de alguns alvos desses miRNAs: PI3KR2, mTOR, ITGA5; e de alguns genes relacionados com angiogênese: VEGF, eNOS, HIF-1 α .

Conclusão: O exercício aeróbico máximo foi um estímulo capaz de alterar a expressão gênica de marcadores angiogênicos circulantes em pacientes com DAP e os c-miRNAs parecem estar envolvidos nesse processo. Por outro lado, a NAC alterou o balanço redox dos pacientes com DAP. Entretanto, o tratamento com NAC aboliu essa resposta angiogênica sistêmica mediada por c-miRNAs ao exercício aeróbico máximo.

Descritores: Exercício; microRNAs; Moduladores de Angiogênese; Antioxidantes; Estresse Oxidativo; Inflamação

ABSTRACT

Silva Junior ND. Profile microRNAs expression of current after an acute exercise session in individuals with peripheral artery disease: role of n-acetylcysteine. "São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016".

Introduction: Peripheral arterial disease (PAD) is a clinical manifestation of atherosclerosis, when it mainly affects the arteries supplying the lower limbs. Aerobic exercise causes the member affected by the disease cycle of reperfusion-ischemia triggers an acute systemic response characterized by increased oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. Thus, an antioxidant therapy is an alternative therapy for these patients. MicroRNAs (miRNAs) have been recognized as post-transcriptional regulators, and identifying these may elucidate additional gene mechanisms by which the exercise is active, leading to identification of genes that are modulated, opening prospects of gene therapy approaches that can lead to picture reversal of peripheral arterial disease. **Aim:** To determine the effect of an acute bout of maximal aerobic exercise with and without the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) on the expression of microRNAs and inflammatory markers and circulating oxidative stress in patients with PAD. **Methods:** We recruited patients with PAD stage II Clinic of Vascular Surgery of Hospital das Clinicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo. The patients underwent two experimental sessions after supplementation of NAC or placebo. the expression profile of circulating microRNAs of individuals at rest and after maximal exercise was analyzed and confirmed the gene expression of miRNAs changed after exercise and its targets; and plasma levels of endothelin-1 (ET-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) cell vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) , reactive substances to thiobarbituric acid, 8-isoprostane and glutathione. **Results:** Treatment with NAC did not change the walking time, and cardiopulmonary hemodynamic responses of patients with PAD. The rest blood flow in the leg of these patients was higher after the completion of the exercise and treatment with NAC did not change this response. After the exercise was increased plasma MCP-1, ET-1, VCAM-1 and TBARS, but the treatment with NAC did not change this response. However, treatment with NAC increased plasma glutathione levels

throughout the experimental session. There were change in the expression of c-miRNAs - 126, -100 and -92a after the exercise and treatment with NAC abolished those answers. We find still change in current gene expression of some targets of these miRNAs: PI3KR2, mTOR, ITGA5; and some angiogenesis-related genes: VEGF, eNOS, HIF-1 α .

Conclusion: The maximum aerobic exercise was a able to change gene expression of circulating angiogenic markers in patients with PAD and c-miRNAs stimulus seem to be involved in this process. Moreover, NAC change the redox balance of patients with PAD. However, treatment with NAC abolished the systemic angiogenic response mediated by c-miRNAs the maximum aerobic exercise.

Descriptors: Exercise; microRNAs; Angiogenesis Modulating Agents; Antioxidants; Oxidative Estress; Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

A doença arterial periférica (DAP) é uma manifestação clínica da aterosclerose afetando principalmente as artérias que irrigam os membros inferiores (Brevetti, Schiano, & Chiariello, 2008; Norgren et al., 2007). A prevalência dessa doença aumenta com o avançar da idade, sendo de 1% na faixa etária de 35-39 anos, 3% de 60-64 anos e chegando a 7% na faixa etária acima de 70 anos (Norgren et al., 2007). Um dos sintomas clássicos da DAP é a claudicação intermitente (CI) (Rose, 1962), este sintoma está presente em torno de 30% dos pacientes com DAP (Becker, McClenny, Kovacs, Raabe, & Katzen, 2002; Norgren et al., 2007).

Os sintomas da DAP ocorrem de forma progressiva com a doença, sendo que um dos primeiros a aparecer é a CI. A CI é denominada como sensação de dor, câimbra, ardência ou formigamento (dor isquêmica), nos membros inferiores, que ocorrem principalmente durante a atividade física e que se intensifica de acordo com a intensidade e duração da atividade. Entretanto, esse sintoma é aliviado alguns minutos após a interrupção da atividade física sem a necessidade de qualquer outra intervenção (Hirsch et al., 2006).

Além disso, estudos em pacientes com DAP tem revelado alterações no fluxo sanguíneo associado com o exercício. Essas alterações estão relacionadas a mudanças na atividade mitocondrial, inflamação e isquemia local (Bhat, Hiatt, Hoppel, & Brass, 1999; Brass & Hiatt, 2000; Brass, Hiatt, Gardner, & Hoppel, 2001; Hiatt, Regensteiner, Wolfel, Carry, & Brass, 1996). Adicionalmente, estudos demonstraram que o exercício físico provoca nos membros inferiores com isquemia uma resposta sistêmica aguda caracterizada

por aumento do estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial, ocasionando maiores níveis plasmáticos de interleucina-8, moléculas de adesão, entre outros fatores (J. J. F. Belch et al., 2002; A. T. Edwards, Blann, Suarez-Mendez, Lardi, & McCollum, 1994; Kirk, Hickman, McLaren, Stonebridge, & Belch, 1999).

Nesse sentido, estudos demonstraram que pacientes com DAP têm aumentos expressivos em marcadores de estresse oxidativo (Brevetti, Giugliano, Brevetti, & Hiatt, 2010; Vita & Hamburg, 2010), como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, tanto no plasma (Hickman et al., 1994; Wijnen et al., 2001), como nos músculos esqueléticos isquêmicos (Pipinos, Judge, et al., 2008; Pipinos, Swanson, et al., 2008), aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio na circulação, como o ânion superóxido, o que afeta diretamente a biodisponibilidade de óxido nítrico o que pode ocasionar uma diminuição da capacidade vasodilatadora desses pacientes (Munzel, Gori, Bruno, & Taddei, 2010). Estudos recentes indicam que um dos principais fatores causadores das alterações vasculares na DAP é o aumento no estresse oxidativo (Brevetti et al., 2010; Munzel et al., 2010; Vita & Hamburg, 2010) e que um tratamento com antioxidante pode ser uma terapia alternativa para esses pacientes.

Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da DAP ainda não estão totalmente elucidados. Nesse contexto, um dos mecanismos que podem estar envolvidos no processo da fisiopatologia da DAP são os microRNAs (miRNAs), uma classe de ácido ribonucleico (RNA) não codificantes de proteínas, responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica de plantas e animais (Kim, 2005). Os mecanismos de

atuação dos miRNAs mostram papéis reguladores em diversos processos, como, proliferação, apoptose, diferenciação celular, hematopoiese, secreção de insulina e funcionamento muscular cardíaco e esquelético (C. Z. Chen & Lodish, 2005; Esau et al., 2004; Thum, Catalucci, & Bauersachs, 2008). Além disso, alguns miRNAs já foram relacionados com processos isquêmicos (miR-126, -424/332, -100) (Bonauer et al., 2009; Caporali et al., 2011; Ghosh et al., 2010; Grundmann et al., 2011; van Solingen et al., 2009) e inflamatório (miR-125, -221, -222, -155, -126) (T. A. Harris, Yamakuchi, Ferlito, Mendell, & Lowenstein, 2008; Hu et al., 2010; Tili et al., 2007; Zhu et al., 2011).

Atualmente estudos já demonstraram que os miRNAs participam das adaptações provenientes do exercício físico, tanto na musculatura esquelética (Aoi et al., 2010; Davidsen et al., 2011; Drummond, McCarthy, Fry, Esser, & Rasmussen, 2008; Fernandes, Magalhaes, Roque, Phillips, & Oliveira, 2012; McCarthy, Esser, Peterson, & Dupont-Versteegden, 2009; Nielsen et al., 2010; Ringholm et al., 2011; Safdar, Abadi, Akhtar, Hettinga, & Tarnopolsky, 2009) quanto na cardíaca (Da Silva et al., 2012; Fernandes et al., 2011; Soci et al., 2011). Além disso, há evidências que o exercício físico aeróbico também altera a expressão de miRNAs circulantes (c-miRNAs), sugerindo assim um potencial valor dos c-miRNAs como biomarcadores e seus possíveis papéis nas adaptações cardiovasculares decorrentes do treinamento físico (Baggish et al., 2011; Uhlemann et al., 2014; Wardle et al., 2015).

Apesar dos avanços de pesquisas com miRNAs e exercícios, até o momento não existem dados sobre a expressão de c-miRNAs em pacientes com DAP após a execução de uma sessão de exercício aeróbico. Estudos a respeito dessa classe de moléculas podem trazer uma maior compreensão

sobre as interações genótípicas e fenotípicas provocadas pelo exercício aeróbio, além de esclarecer as bases moleculares por trás do aumento exacerbado de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo durante o exercício na DAP. Portanto, a descoberta desses fatores pode ajudar na criação de novas terapias que atenuem esta resposta.

Dessa forma, diante da argumentação anterior, as hipóteses desse estudo são que: a) os c-miRNAs que estão envolvidos nos processos inflamatório e angiogênico irão participar do processo isquêmico/inflamatório desencadeado pelo exercício aeróbico agudo em pacientes com DAP tendo suas expressões alteradas após o teste máximo; b) a suplementação oral com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) irá alterar a expressão de c-miRNAs, diminuir o estresse oxidativo e os marcadores de inflamação sistêmica, levando à melhora da tolerância ao esforço em pacientes com DAP.

JUSTIFICATIVA

Os pacientes com DAP possuem uma redução da capacidade de caminhada devido o sintoma clássico da DAP, a claudicação intermitente, ocasionado por ciclos de isquemia-reperusão durante o exercício, que acarreta no aumento exacerbado dos índices de inflamação, estresse oxidativo além da piora da função endotelial. A identificação de mecanismos moleculares que possivelmente estão envolvidos nesse descontrole pode trazer um conhecimento incipiente a respeito dessa fisiopatologia, como é o caso dos c-miRNAs.

Além disso, a utilização do tratamento com antioxidantes pode ser um potencial terapêutico especialmente relevante para pacientes com DAP, uma

vez que a inflamação e o estresse oxidativo são considerados mecanismos chave das alterações vasculares da DAP.

Nesse sentido, estudos com tratamento curto com NAC tem mostrado que esse tratamento atenuou a resposta inflamatória ao exercício em jovens (Neumann et al., 1990; Slattery, Dascombe, Wallace, Bentley, & Coutts, 2014) e aumentou a resistência a fadiga em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Koechlin et al., 2004). Além disso, um recente estudo mostrou em modelo pré-clínico de DAP que o tratamento com NAC melhorou a resistência a fadiga no músculo sóleo (Roseguini, 2014). Dessa forma, essas evidências sugerem que o tratamento com NAC pode ser um potencial terapêutico para os pacientes com DAP.

2. OBJETIVOS

Geral

Verificar o efeito de uma sessão aguda de exercício aeróbico máxima com e sem tratamento do antioxidante N-acetilcisteína sobre a expressão diferencial de microRNAs circulantes em pacientes com doença arterial periférica

Específicos

Verificar os efeitos de uma sessão aguda de exercício aeróbico máxima com e sem tratamento do antioxidante em pacientes com doença arterial periférica sobre:

- A resposta hemodinâmica e cardiopulmonar: frequência cardíaca máxima, pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, consumo de oxigênio pico.
- A hemodinâmica do membro afetado: índice tornozelo/braço e fluxo sanguíneo da perna;
- O perfil dos microRNAs circulantes por *microarray* e os que foram diferencialmente expressos foram confirmados por Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real);
- A expressão gênica dos alvos dos microRNAs circulantes que tiveram sua expressão alterada;
- A quantificação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no plasma sanguíneo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença arterial periférica (DAP)

A DAP consiste em uma obstrução parcial ou completa de artérias que irrigam principalmente os membros inferiores, sendo uma manifestação comum da aterosclerose. Essa doença atinge aproximadamente 27 milhões de indivíduos na Europa e América do Norte (Hirsch et al., 2006). Na Alemanha, um estudo estimou que a prevalência de DAP é de 2 milhões em adultos com idade entre 45 a 75 anos (Kroger et al., 2006). No Brasil, o Projeto Corações do Brasil estimou que aproximadamente 6 milhões de pessoas, com idade superior à 18 anos possuem DAP (Makdisse et al., 2008).

Além disso, essa doença possui um prognóstico extremamente alarmante. Um estudo de 10 anos de seguimento mostrou que pacientes com DAP têm risco relativo 3,1 vezes maior de mortalidade por todas as causas; 5,9 vezes maior risco de mortalidade por doença cardiovascular; e 6,6 vezes maior risco de morte por doença arterial coronariana em comparação aos indivíduos saudáveis (Criqui et al., 1992).

Além disso, esta doença possui como importante característica a oclusão do fluxo sanguíneo arterial dos membros inferiores, devido a obstrução dos vasos, o que pode levar ao aparecimento de sintomas de dor, formigamento, câimbra, ardência ou fadiga muscular, durante a realização de caminhada, mas que desaparece no repouso. Essa dor ocorre devido à isquemia induzida pelo esforço, uma vez que o exercício ocasiona um aumento da necessidade de oxigênio local, que é comprometido nessa doença devido obstrução dos vasos. Este sintoma é conhecido como CI (Rose, 1962), sintoma

presente em torno de 30% dos pacientes com DAP (Becker et al., 2002; Norgren et al., 2007).

O diagnóstico da DAP pode ser realizado por vários métodos, desde o teste de caminhada e o índice tornozelo-braço (ITB) (Nassoura et al., 1996), até métodos de imagem, como por exemplo angioressonância nuclear magnética e a arteriografia (J. M. Edwards & Porter, 1998).

O índice tornozelo-braço (ITB) é um exame simples, não invasivo e de custo baixo, que permite diagnosticar com precisão a gravidade da DAP em pacientes (Norgren et al., 2007). O ITB é a razão entre a maior pressão arterial sistólica (PAS) dos braços e a menor PAS do tornozelo. Para isso, a PAS é medida bilateralmente nas artérias braquiais e pediosas/tibiais e valores de ITB inferiores a 0,90 são sugestivos de DAP (Al-Qaisi, Nott, King, & Kaddoura, 2009).

Além de ser uma doença crônica não transmissível, a DAP é uma doença progressiva, uma vez que os sinais e sintomas se tornam mais graves de acordo com a evolução da doença. Nesse sentido, FONTAINE e colaboradores (Fontaine, Kim, & Kieny, 1954) classificou a DAP em quatro estágios, de acordo com a evolução da doença, conforme apresentado no quadro abaixo:

Quadro 1. Sintomas e sinais característicos dos quatro estágios da doença arterial periférica.

Sintoma ou sinal	ESTÁGIO			
	I	II	III	IV
Parestesia	+/-	++	+++	+++
Dor	Não	AF	Repouso	Repouso
↓ intensidade da pulsação	+/-	++	+++	++++
↓ da quantidade de pelos	+/-	+	++	+++
↓ massa muscular	Não	+	++	+++
↓ temperatura tecidual	Não	+/-	++	+++
Lesões tróficas	Não	Não	Não	Sim
Lesões vasculares	+	++	+++	++++

↓- diminuição; AF – Atividade Física.

As localizações dos sintomas da DAP estão relacionadas ao segmento arterial obstruído (Gardner, Montgomery, Scott, Afaq, & Blevins, 2007). Quando a obstrução é aorto-ilíacas, a dor ocorre nos músculos dos glúteos, da coxa e da parte posterior da perna. Nas obstruções fêmoro-poplíteas, a dor ocorre nos músculos da parte posterior da perna. Já nas obstruções tíbio-fibulares ou das artérias distais do membro inferior, a dor acomete os músculos do pé. Todavia, o local do sintoma mais comumente referido pelos pacientes com DAP, é a musculatura da parte posterior da perna, principalmente no músculo gastrocnêmio, sugestivo de obstrução nos segmentos aorto-ilíacos ou fêmoro-poplíteos (Hirsch et al., 2006).

3.2 Estresse oxidativo e ação antioxidante

O estresse oxidativo é um distúrbio no estado do equilíbrio redox dos sistemas pró-oxidantes e antioxidantes celulares. Distúrbio esse que pode ser ocasionado devido à exposição ambiental aos oxidantes, ingestão inadequada de antioxidantes ou alterações enzimáticas, resultando em níveis exacerbados de índices de danos oxidativos (Sies, Stahl, & Sevanian, 2005). O estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de muitas doenças cardiovasculares (Ginter, Simko, & Panakova, 2014).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), de nitrogênio (ERN) (Emilie et al., 2001), entre outras espécies reativas, são partes integrantes do metabolismo humano observada em diversas condições fisiológicas, como por exemplo, eliminar o agente agressor na fagocitose. Entretanto, quando sua produção é exacerbada e o sistema antioxidante não consegue controlar e restabelecer o equilíbrio, as EROS e ERN provocam danos celulares (Schafer & Buettner, 2001), como por exemplo, afetar diretamente a biodisponibilidade de óxido nítrico e levar à diminuição da capacidade vasodilatadora do vaso (Munzel et al., 2010). Entre as espécies reativas de oxigênio temos, Radical Superóxido (O_2^-), Radical hidroperoxila (HO_2^\cdot), Radical hidroxila (OH^\cdot), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Oxigênio singlet (1O_2), sendo que o OH^\cdot é considerado como o mais lesivo radical conhecido devido o organismo não dispor de mecanismo de defesa (Laurindo, 2003).

O sistema de defesa antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do

radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O . O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathiona (GSH), principal composto antioxidante intracelular por sua função como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidases (GSH-Px), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathiona (GSSG) (Halliwell & Gutteridge, 1990).

A despeito da crescente documentação do papel central do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças (Laurindo, 2003), ultimamente a suplementação com antioxidantes tem sido utilizada com intuito de atenuar o desequilíbrio entre a produção de vasodiladores (ex. óxido nítrico) e vasoconstritores (ex. endotelina-1) e melhorar, portanto, a capacidade vasodilatadora (Munzel et al., 2010). Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre eles a NAC e o mercaptopropionilglicina (MGP). Tais derivados são antioxidantes sintéticos que contêm o grupo -SH em sua composição. O grupo-SH da NAC estimula a síntese de GSH, que como dito anteriormente, servirá como cofator para a enzima GSH-Px para reduzir o H_2O_2 em H_2O , diminuindo assim o estresse oxidativo (Kelly, 1998).

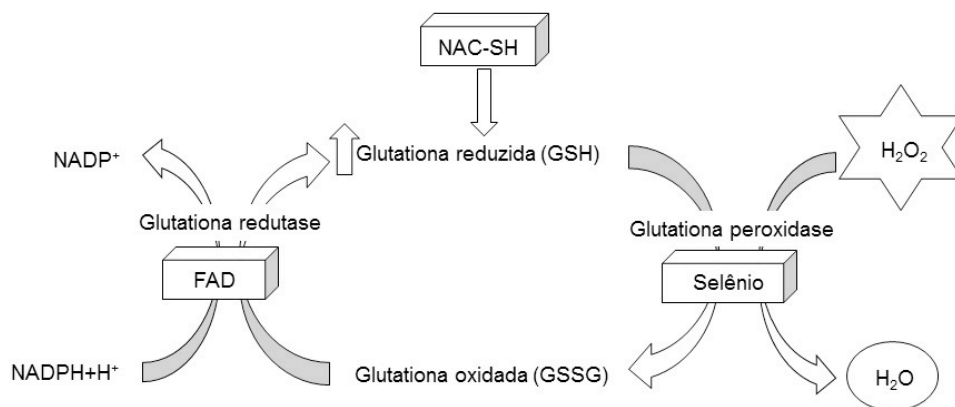


Figura 1: Ação da NAC na enzima glutatona peroxidase no estresse oxidativo, utilização da glutatona reduzida como cofator.

Além de ser um potente antioxidante não específico, a NAC também promove, diretamente, vasodilatação, por meio da abertura de canais de potássio na vasculatura (W. Q. Han et al., 2009). Mais importante, a administração oral deste composto melhora a dilatação vascular dependente de endotélio (Andrews, Prasad, & Quyyumi, 2001; Pieper & Siebeneich, 1998; Zicha, Dobesova, & Kunes, 2006) e aumenta a tolerância à fadiga muscular em indivíduos saudáveis e com algumas condições clínicas, como a doença pulmonar crônica (Ferreira & Reid, 2008).

Evidências derivadas de estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a administração do antioxidante NAC reduz os níveis de estresse oxidativo e melhora a função vascular. Estudo em células endoteliais em cultura mostrou que NAC atenua a apoptose celular induzida pela administração de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e restaura a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Xia et al., 2006).

Em indivíduos jovens, a administração oral da NAC em doses entre 35 e 140 mg/Kg aumentou significativamente os níveis plasmáticos de glutatona,

como dito anteriormente, o tiol não-proteico de maior importância no controle redox celular (Ferreira, Campbell, & Reid, 2011) e que também é capaz de aumentar, de forma independente, a biodisponibilidade de óxido nítrico (Prasad, Andrews, Padder, Husain, & Quyyumi, 1999). Além disso, um estudo em coronariopatas também demonstrou que a infusão intra-arterial de NAC potencializou a vasodilatação dependente do endotélio vascular na artéria femoral (Andrews et al., 2001). Por fim, um ensaio clínico em pacientes com DPOC demonstrou que a suplementação com esta droga por 5 dias consecutivos melhorou a tolerância a fadiga e diminuiu o estresse oxidativo nestes pacientes (van Solingen et al., 2009).

3.3 Estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e função endotelial em pacientes com doença arterial periférica

A fisiopatologia da DAP é composta por três importantes mecanismos. Um desses mecanismos é disfunção endotelial e a consequente baixa capacidade vasodilatadora (Vita & Hamburg, 2010). Pacientes com DAP apresentam diminuição importante na vasodilatação mediada por fluxo (L. M. Harris et al., 1995) e em resposta a infusão de acetilcolina (Liao et al., 1991). Alguns estudos reportam que estes pacientes têm níveis diminuídos de nitrato urinário e GMP cíclico, o que sugere uma redução global na produção de óxido nítrico (Boger et al., 1997). As consequências destas alterações na função vascular são particularmente evidentes durante o exercício, durante o estágio II da doença, referente aos sintomas da CI, quando há aumento da demanda metabólica muscular.

Assim, aliada à obstrução arterial, a diminuição da resposta vasodilatadora ao exercício causada pela disfunção endotelial tem um papel

primordial na gênese da intolerância ao esforço na DAP (Green, 2002). Durante a caminhada, estes pacientes apresentam diminuição rápida e pronunciada na oxigenação dos músculos da panturrilha (Comerota, Throm, Kelly, & Jaff, 2003; Kemp et al., 2001; McCully, Halber, & Posner, 1994), levando à isquemia, dor e interrupção do esforço com recuperação lenta destes índices após o término do esforço (Comerota et al., 2003).

Outra característica desses pacientes é que eles possuem uma menor concentração de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), principal fator angiogênico, na musculatura isquêmica da perna em comparação com a musculatura não isquêmica (Palmer-Kazen, Wariaro, Luo, & Wahlberg, 2004), sugerindo que possa haver uma falta relativa de VEGF na parte isquêmica da perna. No entanto, Palmer-Kazen e colaboradores (Palmer-Kazen, Religa, & Wahlberg, 2009) demonstraram que após a caminhada há um aumento nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de VEGF na musculatura da panturrilha nessa população. Esses autores sugerem que esse aumento é devido à hipóxia promovida pelo exercício nesse músculo em questão, uma vez que a hipóxia estimula o aumento da expressão de VEGF através do aumento de fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1 α) (Shweiki, Itin, Soffer, & Keshet, 1992), sugerindo uma ativação da via de angiogênese local.

Além disso, a isquemia nos membros inferiores, provocada durante o exercício desencadeia um outro mecanismo importante da fisiopatologia da DAP, uma resposta inflamatória local (Brevetti et al., 2010; Palmer-Kazen et al., 2009) e o aumento importante na produção de substâncias vasoconstritoras, como a endotelina-1 (ET-1) (Tsui, Baker, Biecker, Shaw, & Dashwood, 2002, 2004; Tsui & Dashwood, 2005), criando assim um ciclo vicioso, que favorece

ainda mais a vasoconstrição e a diminuição no aporte de oxigênio para os músculos. Ou seja, em indivíduos com a DAP, o exercício induz de forma aguda um aumento nos níveis plasmáticos de interleucina-8 (IL-8), interleucina-6 (IL-6), ICAM-1, VCAM-1, fator von Willebrand, E-selectina, TNF- α , proteína C reativa (PCR) e trombosmodulina (J. J. Belch, Mackay, Hill, Jennings, & McCollum, 1995; J. J. F. Belch et al., 2002; Blann, Dobrotova, Kubisz, & McCollum, 1995; Brevetti et al., 2001; A. T. Edwards et al., 1994; Palmer-Kazen et al., 2009; Signorelli et al., 2003), entre outras.

Além dessas respostas sistêmicas, o exercício desencadeia uma inflamação aguda local em pacientes com DAP. Um estudo (Neumann et al., 1990) demonstrou que imediatamente após a claudicação, o número de neutrófilos totais foram maiores no sangue venoso a partir da perna afetada quando comparado ao sangue arterial.

Outro mecanismo importante da fisiopatologia da DAP e considerado como um dos principais fatores causadores das alterações vasculares é o aumento no estresse oxidativo (Brevetti et al., 2010; Munzel et al., 2010; Vita & Hamburg, 2010). Estudos mostram que pacientes com DAP têm aumentos expressivos dos marcadores de estresse oxidativo, como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma (Hickman et al., 1994; Silvestro et al., 2002; Wijnen et al., 2001) e nos músculos esqueléticos (Pipinos, Judge, et al., 2008; Pipinos, Swanson, et al., 2008) quando comparados a indivíduos saudáveis. Além da inflamação sistêmica crônica (Brevetti et al., 2010), as exposições repetidas da musculatura das pernas a ciclos de isquemia-reperfusão são, possivelmente, um dos principais contribuintes para o aumento exacerbado nos índices de dano oxidativo

observado em pacientes com DAP (Pipinos, Judge, et al., 2008; Pipinos, Swanson, et al., 2008).

Além disso, conforme mencionado anteriormente, o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos, como o ânion superóxido, afeta diretamente a biodisponibilidade de óxido nítrico e pode levar à diminuição da capacidade vasodilatadora (Munzel et al., 2010).

Após essas evidências, esses estudos mostram o entrelaçamento entre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DAP (Figura 1). Assim, temos que os ciclos de isquemia e reperfusão provocados pelo exercício desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica que contribuirá para o aumento exacerbado nos índices de dano oxidativo, que por sua vez, afetará diretamente no aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e no aumento de vasoconstritores levando esses pacientes à um quadro de disfunção endotelial. Sabe-se ainda, que a exposição crônica às moléculas oxidativas pode levar a lesão do DNA mitocondrial (Bhat et al., 1999; Melov, Shoffner, Kaufman, & Wallace, 1995), e afetar diretamente a função muscular que pode acarretar em fraqueza e aumento na fadiga dos músculos (Moylan & Reid, 2007; Powers, Kavazis, & DeRuisseau, 2005; Powers, Kavazis, & McClung, 2007) ocasionando assim uma diminuição da tolerância ao exercício desses pacientes.



Figura 2: Papel central do aumento no estresse oxidativo na fisiopatologia da DAP.

A despeito da crescente documentação do papel central do estresse oxidativo na fisiopatologia da DAP (Pipinos, Judge, et al., 2008), poucos estudos até hoje avaliaram o potencial terapêutico de antioxidantes nestes pacientes.

Nesse contexto, um estudo demonstrou que o comprometimento sistêmico da função endotelial proporcionado pelo exercício máximo em indivíduos com CI, foi prevenido com a suplementação de vitamina C, resultado esse observado devido diminuição dos níveis de molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e de TBARS (Silvestro et al., 2002). Ainda nessa perspectiva, estudos com drogas antioxidantes em outras populações mostraram uma série de benefícios como mostrado em um tópico anterior dessa revisão (Andrews et al., 2001; Koechlin et al., 2004). Esses dados nos sugerem que a suplementação com antioxidantes pode ser uma terapêutica alternativa para os pacientes com DAP, que sabidamente apresentam aumento

de estresse oxidativo, estado inflamatório crônico e capacidade vasodilatadora reduzida.

Um dos compostos antioxidantes mais promissores para o tratamento destes indivíduos é a NAC (Hernandez, Cheng, & Westerblad, 2012), pois, além de ser um potente antioxidante não específico, a NAC também promove vasodilatação (W. Q. Han et al., 2009). Mais importante, a administração oral deste composto melhora a dilatação vascular dependente de endotélio (Andrews et al., 2001; Pieper & Siebeneich, 1998; Zicha et al., 2006) e aumenta a tolerância à fadiga muscular em indivíduos saudáveis e com algumas condições clínicas, como a doença pulmonar crônica (Ferreira & Reid, 2008), fatores esses observados também em pacientes com DAP.

Dessa forma, apesar de sabermos que as consequências sistêmicas e locais proporcionadas pelo exercício em pacientes com DAP são aumento na inflamação, estresse oxidativo que proporciona uma disfunção endotelial, os mecanismos moleculares que regulam essas consequências precisam ser melhor elucidados, e os miRNAs que são pequenas moléculas de RNAs com um grande poder regulatório pode estar envolvido nessa regulação. Além disso, o tratamento com NAC pode ser um tratamento terapêutico alternativo para esses pacientes.

3.4 MicroRNAs: conceitos, biogêneses e função

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Kim, 2005). O primeiro miRNA descoberto foi o Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*) em 1993, sendo nesta época esse foi associado ao controle temporal do

desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (R. C. Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993; Wightman, Ha, & Ruvkun, 1993).

Recentemente, estudos com miRNAs vêm delineando um amplo campo de grande ascensão. Em 2005, havia 465 miRNAs descobertos em humanos (Berezikov et al., 2005), sendo que em 2008 esse número chegou a 533. Até o momento, mais de 2578 sequências de miRNAs, de mais de 50 tipos de organismos diferentes foram catalogados no banco de dados miRBase e mais de 1800 miRNAs diferentes foram clonados e sequenciados em humanos (Fiedler, Gupta, & Thum, 2012; Kawashima & Shioi, 2011; Kingwell, 2011).

Os miRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas do genoma, em íntrons e também em éxons, tanto de genes codificadores para proteína quanto de genes não codificadores (Olena & Patton, 2010).

O processo de biogênese dos miRNAs é iniciado com a transcrição destes no núcleo celular, sendo que na sua grande maioria é transcrito pela RNA Polimerase II (Bartel, 2004).

Primeiramente são formados os pri-miRNA, que contém centenas de nucleotídeos (~300 nucleotídeos) que serão processados dentro do núcleo por uma ribonuclease III chamada Drosha (Y. Lee et al., 2003) juntamente com a proteína de ligação Pasha (DGCR8) (J. Han et al., 2004). O produto dessa clivagem gera um molécula menor chamada pre-miRNA, que é transportada para o citoplasma via mecanismo dependente de Exportina-5 e Ran-GTP (Lund, Guttinger, Calado, Dahlberg, & Kutay, 2004).

Em seguida os pré-miRNAs são clivados por outra RNase III chamada Dicer, para formar o miRNA maduro, fita dupla (miRNA:miRNA), o qual uma das suas fitas será incorporada em um complexo de ribonucleoproteína,

complexo de silenciamento induzido de RNA (RISC), o qual contém a proteína argonata como um dos principais componentes. Nessa fase do processamento, uma fita do miRNA será transformada em miRNA maduro e a outra degradada (Gregory, Chendrimada, Cooch, & Shiekhattar, 2005), e como parte do complexo RISC os miRNAs irão interagir com seus RNAm alvos (Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). A abundância dos miRNAs pode ser controlada na transcrição do pri-miRNA, durante qualquer passo da biogênese e no *turnover* do miRNA maduro (Schwarz, Grande, Bujdosó, Saedler, & Huijser, 2008).

Os miRNAs possuem mecanismos de ação específicos. Esses reguladores pós-transcricionais exercem seus efeitos ligando-se à região 3' não traduzida de RNAm alvos. Este mecanismo de atuação promove a redução da expressão proteica através do controle traducional (Kim, 2005). Esse mecanismo de ligação depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo gerar inibição traducional (complementaridade parcial) ou degradação do RNAm (complementaridade total).

Outros mecanismos de ação possíveis dos miRNAs são, deadenilação, degradação e captura dos RNAm nos *P-bodies* (focos citoplasmáticos) (Fazi & Nervi, 2008). O mecanismo de ação via *P-bodies* ocorre da seguinte forma, um miRNA ligado a uma proteína argonata reconhece seus RNAm alvos por pareamento de bases; a proteína argonata, localizada nos *P-bodies*, vai interagir com o GW182, depois o complexo RNAm-miRNA-Argonata é encaminhado aos *P-bodies*. No *P-body*, o RNAm alvo é deadenilado pelas enzimas deadenilases presentes, então degradado ou até mesmo removido da

maquinaria traducional (Pillai et al., 2005; Valencia-Sanchez, Liu, Hannon, & Parker, 2006).

Estudos mostram que um único miRNA é capaz de regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas, ou seja, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o mRNA, levando-o à degradação. No entanto, já se tem exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (Montgomery & van Rooij, 2011; Nozawa, Miura, & Nei, 2012). Entretanto, em animais, a maioria dos miRNAs liga-se na região 3'-UTR do mRNA-alvo com complementaridade imperfeita funcionando como repressor traducional.

Como essa classe de RNAs possui sequências pequenas, um único miRNA pode regular diversos RNAm-alvo (Bartel, 2004). Além disso, vários miRNAs podem atuar num mesmo RNAm-alvo (Brennecke, Stark, Russell, & Cohen, 2005; Valencia-Sanchez et al., 2006).

Estima-se a partir de predição por programas de bioinformática, que essa classe de RNAs pode ter como alvo 30% do genoma humano (Lewis, Burge, & Bartel, 2005). Outras estimativas afirmam que mais de 50% dos genes humanos que codificam proteínas podem ser reguladas por esses RNAs (Wu, Yang, & Li, 2009).

As estimativas são criadas através de vários algoritmos de predição de alvos de miRNA, entre eles temos: mirwalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), miRBase (<http://www.micro-RNA.sanger.ac.uk/targets/v2/>), Miranda (<http://www.micro-RNA.org//miranda.htm>), TargetScan (<http://www.genes.mit.edu/targetscan>),

PicTar (<http://www.pictar.bio.nyu.edu>) (Chaudhuri & Chatterjee, 2007), entre outros.

A partir dessas análises de predição, atualmente os miRNAs têm sido associados à regulação de diversos mecanismos e funcionamento muscular cardíaco e esquelético (C. Z. Chen & Lodish, 2005; Esau et al., 2004; Thum et al., 2008). Adicionalmente, análises de bioinformática de dados de *microarray* de miRNAs, têm identificado miRNAs que são altamente expressos em tecidos específicos, como, fígado, cérebro, hipófise, pâncreas, testículos, músculo estriado esquelético (Sood, Krek, Zavolan, Macino, & Rajewsky, 2006), cardíaco (van Rooij, Marshall, & Olson, 2008) e na circulação (Mitchell et al., 2008).

3.5 MicroRNAs circulantes

Alguns estudos recentes têm demonstrado a existência de miRNAs maduros no fluido extracelular, como por exemplo, no sangue total, plasma, plaquetas e soro (X. Chen et al., 2008; Weber et al., 2010).

Além disso, têm sido observado que os miRNAs circulantes são bastante estáveis em diversas situações como, pH elevado e baixo, ebulição, congelamento e descongelamento e armazenamento a longo prazo à temperatura ambiente, tornando-os apropriados para utilização como biomarcadores no sangue (X. Chen et al., 2008; Weber et al., 2010).

Para ser considerado um biomarcador ideal, a molécula analisada deve ser tecido específico, doença específica, com meia-vida longa e facilmente detectável e quantificável em laboratórios, além de serem facilmente acessíveis em procedimentos não invasivos, os c-miRNAs parecem cumprir essas características (Kondkar & Abu-Amero, 2015).

Atualmente os c-miRNAs tem sido alvo de grande interesse para se tornarem um novo biomarcador de doenças, como por exemplo, em doenças cardiovasculares. Estudos têm tentado utilizar os c-miRNAs como biomarcadores de insuficiência cardíaca (Corsten et al., 2010), no infarto agudo do miocárdio (Ai et al., 2010; Cheng et al., 2010), síndrome aguda da coronária (Widera et al., 2011), na doença arterial coronariana (Fichtlscherer et al., 2010), entre outras doenças.

A estabilidade dos c-miRNAs no fluido extracelular sugere a existência de mecanismos que os protegem contra degradação fora da célula. Nesse sentido, algumas teorias têm sido descritas para explicar o transporte e a estabilidade dos c-miRNAs, como por exemplo, a teoria que os c-miRNAs são protegidos por encapsulamento em vesículas de membrana, devido esses miRNAs terem sido detectados em microvesículas de sangue periférico (Hunter et al., 2008). Nesse sentido, um estudo demonstrou a presença do miR-150 em microvesículas de pacientes com aterosclerose. Além disso, esse miRNA regula a migração e a expressão do seu alvo, c-MYB, o que sugere que os c-miRNAs podem mediar a comunicação intercelular e regular a expressão de genes intracelulares (Zhang et al., 2010).

Outro tipo de microvesículas de membrana que podem proteger e transportar os c-miRNAs são os corpos apoptóticos, Zerneck e colaboradores mostraram que células endoteliais derivadas de corpos apoptóticos em camundongos são enriquecidas de miR-126 (Zernecke et al., 2009). Os c-miRNAs também podem serem secretados segregados em exossomos, quando um corpo multivesicular funde com uma membrana plasmática e liberta os exossomos (K. Wang, Zhang, Weber, Baxter, & Galas, 2010).

Apesar das microvesículas, a maioria dos c-miRNAs existem em uma forma não vesícula, e sim ligados a complexos de proteínas, como ligado a nucleoplasmina, uma proteína nuclear implicada na exportação ribossomal (K. Wang et al., 2010). Uma outra proteína é a Argonauta 2, foi demonstrado que nessa proteína derivada do plasma sanguíneo humano contém miRNAs específicos, como o miR-92a (Arroyo et al., 2011) . Além disso, um estudo demonstrou a presença de miRNAs em lipoproteínas de alta densidade (HDL) isolados de pacientes com hipercolesterolemia familiar (Vickers, Palmisano, Shoucri, Shamburek, & Remaley, 2011), sugerindo assim que lipoproteínas podem transportar miRNAs. Entretanto, nenhum desses modos de secreção têm seu papel totalmente elucidados em condições fisiológicas e patológicas.

Para que os c-miRNAs possam ser utilizados como biomarcadores de doenças, precisamos ainda de mais estudos na literatura comparando a expressão dessas moléculas com biomarcadores tradicionais utilizados em doenças específicas, como por exemplo, estudos com pacientes infartados comparando a expressão de c-miRNAs com a dosagem de troponina. No entanto, em um futuro próximo, os c-miRNAs podem começar a serem utilizados como uma importante ferramenta para diagnóstico e prognóstico de doenças.

3.6 MicroRNAs: participação em processos angiogênicos, isquêmicos, inflamação e na doença arterial periférica

Atualmente, algumas questões têm sido levantadas a respeito da participação dos miRNAs em processos angiogênicos, isquêmicos e na inflamação.

Uma das primeiras evidências que estes RNAs regulam a angiogênese foi em um estudo de 2005 (W. J. Yang et al., 2005) que demonstrou o papel da enzima Dicer no desenvolvimento da angiogênese durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. Neste estudo foi observado que a presença da enzima Dicer é essencial para a formação de vasos no período embrionário.

A primeira grande análise de expressão gênica de miRNAs em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECS) identificou quinze miRNAs altamente expressos. Além disso, análises de predição mostraram os receptores de fatores angiogênicos (Flt-1, Nrp-2, Fgf-R, c-Met, c-kit) como os alvos desses miRNAs (Poliseno et al., 2006). Dentre os miRNAs envolvidos na angiogênese tanto com ação angiogênica e quanto anti-angiogênica temos, membros da família let-7, o miR-21, miR-126, miR-221, miR-222, miR-15b, miR-16, miR-20, miR-92a, miR-320, miR-378, miR-296, miR-328, cluster miR-17-92 (Bonauer et al., 2009; Y. Chen & Gorski, 2008; Fasanaro et al., 2008; Kuehbacher, Urbich, Zeiher, & Dimmeler, 2007; X. H. Wang et al., 2009; Wu et al., 2009).

Um dos principais miRNAs envolvidos na regulação angiogênica é o miR-126, esse miRNA aumenta a expressão de VEGF e da via de sinalização do VEGF a partir da inibição de dois dos seus alvos, proteína relacionada a brotamento (Sprd-1) e a subunidade regulatória dois da PI3K (PI3KR2, também conhecido como p85- β) (Fish et al., 2008).

Além disso, em outro estudo foi mostrado que o miR-126 participa da resposta angiogênica após a ligadura da artéria femoral de animais. Para isso, foi avaliado o número de capilares marcados com CD31 do músculo gastrocnêmio dos animais tratados com injeção de antagomir (molécula

sintética inibidora de miRNA) para o miR-126, e verificou-se que a expressão desse miRNA e a densidade muscular estavam diminuídos nesse músculo desses animais em comparação aos animais não tratados com essa molécula (van Solingen et al., 2009).

Além do miR-126, alguns estudos têm demonstrado a participação de outros miRNAs participando de mecanismos angiogênicos após processos isquêmicos, como o estudo de Bonauer e colaboradores (Bonauer et al., 2009) os quais mostraram que o miR-92a possui a sua expressão aumentada em modelo experimental com isquemia de membros posteriores. Adicionalmente, observou-se que a recuperação do fluxo sanguíneo foi maior nos animais tratados com antagomir para o miR-92a, o que ocasionou um maior número de capilares e de músculo liso nesses animais. Esses resultados indicam que o antagomir do miR-92a melhora a perfusão e recuperação funcional dos membros isquêmicos. Este estudo demonstra ainda que a subunidade $\alpha 5$ da integrina (ITGA5) é um alvo para esse miRNA, e que esta possui um papel importante no desenvolvimento vascular e angiogênese (Francis et al., 2002; J. T. Yang, Rayburn, & Hynes, 1993).

Outro miRNA envolvido na resposta isquêmica é o miR-424/322, Gosh e colaboradores mostraram que em células endoteliais humanas e de camundongos há um aumento de expressão do miR-424 e miR-322 (homólogo do miR-424 em camundongos) quando expostas à hipóxia, enquanto que a proteína Cullin 2 (CUL2), alvo desse miRNA, teve sua expressão diminuída nessa situação (Ghosh et al., 2010). A CUL2 desempenha um papel crucial na montagem do complexo E3-ubiquitina ligase, uma vez que ela capta as moléculas de HIF-1 α e HIF-2 α para a montagem desse complexo (Merlet,

Burger, Gomes, & Pintard, 2009). Além disso, este estudo mostrou esse perfil de expressão miRNA/alvo em modelo experimental de isquemia de membros posteriores (ligadura da artéria femoral). Dessa forma, o miR-424/miR-322 contribui para a angiogênese em situações de hipóxia, devido a inibição da proteína CUL2, o que facilita a ativação gênica do VEGF via HIF-1 α (Merlet et al., 2009).

Outro estudo que mostrou a participação de miRNA envolvido no processo angiogênico após processo isquêmico foi o estudo de Grundmann e colaboradores, este estudo mostrou que a diminuição do miR-100 aumenta a angiogênese em modelo experimental de isquemia de membros posteriores. Observaram ainda que esse miRNA modula a proliferação, formação de tubo, e atividade de brotamento das células endoteliais e migração de células musculares lisas. Esse miRNA possui como alvo a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Grundmann et al., 2011). O gene da mTOR é requerido para angiogênese e proliferação de células endoteliais em resposta à hipóxia (Humar, Kiefer, Berns, Resink, & Battegay, 2002; W. Li et al., 2007). O tratamento com antagomir para o miR-100 em animais com isquemia de membros posteriores proporcionou um maior fluxo sanguíneo para essa região quando comparado com animais sem o tratamento, somado a uma maior expressão da mTOR. Este estudo sugere que o miR-100 pode ser um novo e promissor alvo para terapia de doenças cardiovasculares e neoplásicas (Grundmann et al., 2011).

Outro elegante estudo mostrou a participação de um miRNA na função endotelial e angiogênese reparativa em *diabetes mellitus*. Caporali e colaboradores mostraram que o miR-503 contribui para a piora da função

endotelial e angiogênese reparativa após isquemia de membros inferiores nessa doença. Inicialmente os autores observaram um aumento de expressão desse miRNA *in vitro*, em cultura de células que mimetizam *diabetes mellitus* e isquemia. Além disso, mostraram também esse aumento de expressão em células endoteliais humanas e por fim em músculo de membros inferiores isquêmicos de pacientes diabéticos. Ainda, mostraram que a expressão do miR-503 possui uma correlação inversa com a expressão da proteína cdc25A em músculo desses pacientes, além de uma alta expressão desse miRNA no plasma desses pacientes, sugerindo dessa forma uma importante participação desse miRNA nesse processo (Caporali et al., 2011).

Todos esses estudos demonstram que os miRNAs parecem possuir um envolvimento no controle de revascularização em situações de isquemia, como o encontrado em pacientes com DAP quando submetidos a uma sessão de exercício aeróbico.

Ultimamente estudos na literatura sugerem a participação dos miRNAs em outro importante processo, a inflamação. Como é o caso do miR-125b, que possui como alvo o TNF- α (Tili et al., 2007), importante marcador inflamatório. Outro estudo mostrou que esse miRNA também possui como alvo a ET-1 em células endoteliais, que também possui um papel importante no processo inflamatório endotelial (D. Li et al., 2010). Além disso, outros miRNAs também possuem como alvo a ET-1, são eles, o miR-221 e miR-222 (Zhu et al., 2011).

Harris e colaboradores mostraram a participação do miR-126 no processo inflamatório, pois esse miRNA possui como alvo a molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1), ou seja, esse miRNA possui uma função anti-inflamatória. Nesse estudo, foi mostrado também que a diminuição da

expressão do miR-126 proporciona um aumento da expressão do TNF- α estimulado pelo aumento da expressão da VCAM-1 (T. A. Harris et al., 2008).

Além disso, outros estudos vêm demonstrando alguns miRNAs que inibem as citocinas inflamatórias, como o caso do miR-31 que possui como alvo a E-seletina (Suarez, Wang, Manes, & Pober, 2010), o miR-17-3p que possui como alvo a ICAM-1 (Suarez et al., 2010) e o miR-124a, que possui como alvo a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (Nakamachi et al., 2009). Adicionalmente, alguns miRNAs são induzidos por respostas pró-inflamatórias, tais como, aumento de TNF- α , interleucinas e receptores do tipo Toll (TLRs), são eles miR-146 (Williams, Perry, Moschos, Lerner-Svensson, & Lindsay, 2008), -155 (O'Connell, Taganov, Boldin, Cheng, & Baltimore, 2007) e -21 (Fujita et al., 2008).

Apesar dessas evidências, a participação dos miRNAs nesses processos (angiogênico, isquêmico, inflamatório e estresse oxidativo) em pacientes com DAP é um campo de estudo promissor, uma vez que um recente estudo demonstrou o perfil de expressão de c-miRNAs de pacientes com DAP. Este estudo nos demonstra que os miRNAs que tiveram sua expressão alterada nesses pacientes na sua maioria, possuem alvos envolvidos com angiogênese e inflamação. Stather e colaboradores, identificaram 53 miRNAs diferentemente expressos, quando comparado aos indivíduos saudáveis, destes 34 estavam com uma menor expressão e 19 com uma maior expressão. Após algumas validações, destes 34 restaram significativamente diferentes apenas 12 miRNAs (miR-let-7e, -15b, -16, 20b, -25, -26b, -27b, -28-5p, -126, -195, -335 e -363). Com esse estudo, os autores sugerem um possível papel diagnóstico dos miRNAs em pacientes com DAP

(Stather et al., 2013). Além disso, o mesmo grupo mostrou em outro estudo a expressão de c-miRNAs em pacientes com PAD associados a aneurisma aórtico abdominal e encontraram 4 miRNAs alterados nesses pacientes quando comparado a indivíduos saudáveis (miR-let-7e, -15b, 196b e -411) (Stather et al., 2015).

Além disso, outro recente estudo tentou mostrar a relação da expressão dos c-miRNAs -130a, -27b e 210 e estresse oxidativo em pacientes com DAP, nesse estudo foi demonstrado que a expressão desses miRNAs estão aumentadas na circulação desses pacientes e esses miRNAs possuem como alvo marcadores de estresse oxidativo, como TBARS isoprostanos (Signorelli et al., 2016).

Entretanto, esses estudos analisaram o perfil de c-miRNAs nos pacientes com DAP em repouso. No entanto, como dito anteriormente, o exercício aeróbico (caminhada) é responsável por ocasionar ciclos de isquemia-reperfusão nesses pacientes e esses ciclos desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares, como um aumento da inflamação e de estresse oxidativo, que podem ser regulados por miRNAs. Porém, até o momento não há dados se os miRNAs participam desses processos desencadeados pela caminhada em pacientes com DAP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Para este estudo, treze pacientes com DAP estágio II foram recrutados do Ambulatório da Disciplina de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer 189.465).

Como critérios de inclusão no estudo, os indivíduos deveriam apresentar as seguintes características: 1) ITB \leq 0,9 em pelo menos um dos membros inferiores; 2) Estágio II da DAP, segundo os critérios de Fontaine; 3) capacidade de caminhar em esteira pelo menos 2 minutos com velocidade de 3,2 km/h.

Além disso, não foram incluídos no estudo os indivíduos que tinham os seguintes critérios: 1) presença de úlceras nos pés e/ou pernas; 2) isquemia crítica; 3) incapacidade para andar em esteira rolante; 4) hipertensão e/ou diabetes descontrolada; 5) infarto do miocárdio recente; 6) tenham sido submetidos a angioplastia ou qualquer procedimento cirúrgico vascular nos membros inferiores e 7) que estavam recebendo tratamento medicamentoso com antibióticos, antioxidantes, pentoxifilina ou cilostazol. Os pacientes foram submetidos a duas sessões de familiarização com o teste progressivo em esteira rolante. Foram excluídos pacientes que apresentaram variação na distância percorrida superior a 15% entre o primeiro e o segundo teste, os indivíduos que não tomaram a NAC corretamente. Foram incluídos no total 13 pacientes. Destes pacientes, 3 indivíduos não completaram o protocolo experimental pelos seguintes motivos: um paciente retirou o consentimento

após a primeira sessão, um paciente desenvolveu uma úlcera isquêmica no pé. Outro paciente foi excluído devido a dificuldades técnicas durante uma sessão experimental (queda de energia). Assim, o projeto foi desenvolvido com 10 pacientes.

4.2 Avaliação clínica

Todos os voluntários foram avaliados por um médico, que levantou o histórico de saúde e o uso de medicamentos, além de fazer uma avaliação clínica e ortopédica. Foram excluídos do estudo, os indivíduos que não se enquadraram nos critérios descritos anteriormente e também aqueles que apresentaram problemas ortopédicos que contraindicassem o exercício. Os indivíduos foram instruídos a não modificar a medicação (tipo e dose) durante todo o estudo e, se houvesse modificação, o indivíduo seria excluído do estudo.

4.3 Diagnóstico da doença arterial periférica

O diagnóstico da DAP foi feito pelos seguintes critérios: 1) ITB em repouso (Hirsch et al., 2006; Norgren et al., 2007) e 2) classificação de Fontaine II, com presença de sintomas de claudicação, como dor, câimbra, ardência e formigamento nos membros inferiores durante um teste de esforço máximo (Hirsch et al., 2006; Norgren et al., 2007). Para tanto, as PAS do braço e do tornozelo foram medidas em triplicata nos dois membros.

A aferição da pressão arterial no braço foi feita com o uso de um estetoscópio da marca Littman e esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. Para estas medidas, os indivíduos eram colocados em um ambiente calmo e deveriam ficar em repouso deitado por pelo menos 5 minutos. O manguito foi colocado no braço do indivíduo, cerca de 2 a 3 cm acima da fossa antecubital,

centralizando a bolsa de borracha sobre artéria braquial. Após posicionar a campânula do estetoscópio sobre a artéria braquial, o manguito era inflado até 20 mmHg acima do nível estimado da PAS e desinflado lentamente. A determinação da PAS foi feita no momento do aparecimento do primeiro som (fase I de Korotkoff).

Para a medida da PAS no tornozelo foi utilizado um equipamento Doppler ultrassom (Direcional DD702, IMBRACRIOS®). Foi colocado um manguito na perna dos indivíduos dois a três cm acima do maléolo medial, que foi inflado até 20 mmHg acima do nível estimado da pressão arterial sistólica e desinflado lentamente. A PAS foi determinada pelo aparecimento do primeiro som detectado pelo equipamento Doppler durante a desinflação.

As duas medidas (braço e tornozelo) foram realizadas simultaneamente por dois avaliadores experientes. Em posse desses dados, foi calculado o ITB de cada lado do corpo por meio da divisão da pressão arterial sistólica do tornozelo pela pressão arterial sistólica do braço. A presença da DAP nestes indivíduos foi caracterizada por um ITB $\leq 0,90$ em repouso em um ou nos dois membros.

Como exame auxiliar, a palpação dos pulsos arteriais periféricos (femoral, poplíteo, tibial posterior e pedal) (Hirsch et al., 2006; Norgren et al., 2007) foi realizada nos dois membros inferiores por um médico experiente, com o objetivo de verificar o local da obstrução na artéria em cada membro afetado.

4.4 Diagnóstico de obesidade

O peso e a estatura foram medidos em uma balança (Welmy) e o índice de massa corporal (IMC) foi calculado pelo quociente entre o peso (kg) e o quadrado da estatura (m^2). Participaram do estudo apenas os indivíduos com $IMC \leq 35kg/m^2$.

4.5 Medida da pressão arterial

A pressão arterial dos indivíduos foi medida em ambos os membros superiores, utilizando o método auscultatório, com um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio e empregando-se as fases I e V dos sons de Korotkoff para a identificação dos valores de PAS e pressão arterial diastólica (PAD), respectivamente. As medidas foram realizadas com os indivíduos sentados em repouso por pelo menos 5 minutos. Foram medidas a pressão arterial em cada braço, até que se obtivesse 3 valores consecutivos com diferença inferior a 5 mmHg, e este procedimento foi realizado em duas visitas ao laboratório em dias distintos. Para a definição do valor da pressão arterial, foram considerados os valores obtidos no braço com maior pressão arterial e foi calculada a média das seis medidas válidas (diferença inferior a 5 mmHg neste braço) (Hipertensão, 2010). Somente foram incluídos no estudo os voluntários com PAS e PAD menores que 160 e 105 mmHg, respectivamente. Estes são os valores aceitos pelo American College Sports Medicine para se iniciar sessões de exercício físico ("American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults," 1998).

4.6 Administração de NAC/Placebo

O antioxidante NAC e o placebo foram administrados por meio de pastilhas efervescentes com 900 mg de NAC e com sabor artificial de frutas selvagens (PharmaNAC, BioAdvantex Pharma Inc). Os pacientes foram instruídos a tomar 2 pastilhas por dia, no almoço e no jantar, respectivamente, nos 4 dias que antecederem a sessão experimental (somando na fase com NAC uma dose diária de 1800 mg). No quinto dia (sessão), os pacientes

receberam 3 pastilhas efervescentes (totalizando 2700 mg de NAC na sessão sob essa medicação).

As reações adversas à administração de NAC são raras, sobretudo após ingestão por via oral (Ghosh et al., 2010). Contudo, doses mais altas (>70 mg/kg) podem se associadas a reações gastrointestinais (náusea, diarreia, dispepsia), sonolência, sensação de desfalecimento e reações periféricas como prurido, conjuntivite alérgica e eritema. Para monitorar eventuais reações adversas à ingestão da droga, um médico estava à disposição durante todo o estudo. O uso do medicamento seria imediatamente interrompido no caso de aparecimento de qualquer efeito colateral e, se necessário, seria utilizado um anti-histamínico (difenidramina) (Ghosh et al., 2010).

4.7 Protocolo Experimental

Os pacientes que se voluntariaram participar do estudo realizaram quatro visitas ao laboratório. Os pacientes foram, inicialmente, convidados a visitar o laboratório em dois dias consecutivos para a familiarização com o teste da caminhada em esteira rolante. Os pacientes que demonstraram boa reprodutibilidade nas distâncias percorridas (variação <15% na distância máxima percorrida) foram incluídos no estudo e convidados a retornar ao laboratório para duas sessões experimentais, separadas por, pelo menos, 19 dias.

Em ordem aleatória, os pacientes receberam, antes de cada sessão, NAC ou placebo por 4 dias consecutivos. No quinto dia após o início da medicação, a sessão aguda de exercício aeróbio máximo foi realizada e os pacientes retornaram ao laboratório e receberam uma dose adicional do composto ou do placebo uma hora antes da realização do teste de caminhada.

Após a finalização da primeira sessão experimental, foi realizado um período de, no mínimo, 19 dias sem nenhum dos tratamentos (nem placebo nem NAC, chamado de *washout*) e, então, os voluntários receberam o segundo tratamento por 4 dias e realizaram a segunda sessão experimental.

Para a realização das sessões experimentais, os pacientes foram instruídos a não realizarem atividades físicas extenuantes por pelo menos 48 horas e não consumirem bebidas alcoólicas por pelo menos 48 horas antes do experimento. Eles deveriam ainda fazer uma refeição leve 2 horas antes da sessão experimental e não deviam ingerir nessa refeição substâncias que modifiquem as respostas cardiovasculares, como café, chá, etc. Os pacientes foram questionados quanto à alimentação no dia da primeira sessão experimental e foram instruídos a consumir uma dieta semelhante no dia da segunda sessão.

As sessões tiveram duração aproximada de três horas e ocorreram no período da tarde. O desenho experimental dessas sessões está apresentado na Figura 3. Após chegarem ao laboratório, os pacientes tinham um cateter introduzido em uma veia na região antecubital do braço esquerdo para a retirada de amostras sanguíneas durante a sessão experimental. Esse cateter foi mantido patente por salinização. Após ~10 minutos (min) de repouso na posição supina, a primeira amostra de sangue (15 ml) foi retirada. Os pacientes receberam a solução experimental (NAC/placebo) e repousaram por 1 hora. Estudos anteriores mostraram que a concentração de pico de NAC no sangue ocorre em torno de 60 min após a ingestão oral (Borgstrom & Kagedal, 1990; Borgstrom, Kagedal, & Paulsen, 1986). Durante este período de repouso, nos 30 min finais, os pacientes deitaram e foram instrumentados com manguitos na

perna e no braço esquerdo para avaliação da capacidade vasodilatadora. Ao final dos 60 min, uma segunda amostra de sangue (15 ml) foi coletada. Em seguida, a pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas em triplicata e foi realizado o protocolo de avaliação da capacidade vasodilatadora da perna mais afetada. Essa avaliação teve duração aproximada de 20-25 min. Em seguida, os pacientes realizaram um teste progressivo em esteira rolante. Ao final do teste, eles retornaram imediatamente à posição deitada e uma nova coleta de sangue foi realizada (15 ml). Após 30 min, nova amostra de sangue foi coletada (15 ml), a pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas em triplicata e, em seguida, a capacidade vasodilatadora foi avaliada.

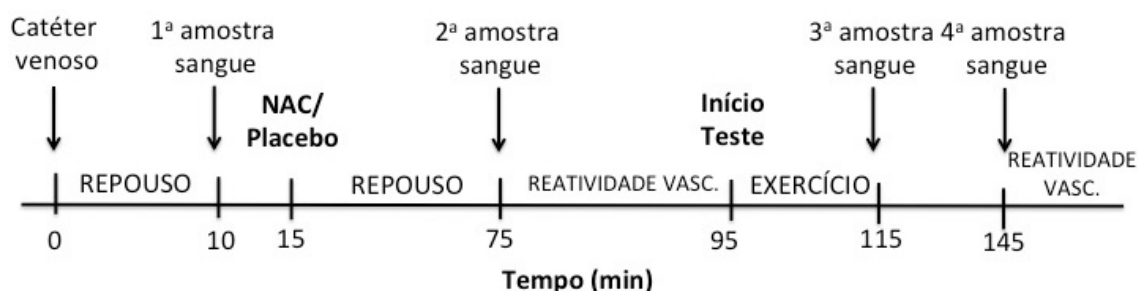


Figura 3: Protocolo experimental. Os pacientes receberam NAC ou placebo (ordem aleatória) por 4 dias consecutivos e no quinto dia retornaram ao laboratório para realizar o protocolo experimental delineado acima. Uma dose final do composto ou placebo foi administrada e após uma hora de repouso foi realizado um teste para avaliação da função vascular e um teste incremental em esteira rolante. Quatro amostras de sangue foram coletadas durante o protocolo para mensuração de marcadores plasmáticos de estresse oxidativo, substâncias vasoativas e marcadores inflamatórios.

4.8 Técnicas e medidas

4.8.1 Teste progressivo máximo

O teste progressivo máximo foi realizado com protocolo específico para a população com DAP (Gardner, Skinner, Cantwell, & Smith, 1991). O teste iniciou e se manteve em velocidade constante de 3,2 km/h, com incrementos de 2% de inclinação a cada dois minutos até a exaustão. Durante o teste, a frequência cardíaca foi continuamente monitorada por um eletrocardiógrafo (Cardio Perfect) e foi registrada ao final de cada minuto. A pressão arterial foi medida a cada 2 minutos com o método auscultatório descrito anteriormente. A percepção da dor e do esforço foram verificadas a cada minuto, respectivamente, pela utilização da escala de dor de 1-10 e da escala de esforço de 6-20 de Borg (Borg, 1990). No momento em que o indivíduo relatava o início do sintoma de dor no membro inferior foi anotado a distância de claudicação. O teste foi interrompido quando o indivíduo não suportava mais a dor e, neste momento, foi anotada a distância total de marcha. O consumo de oxigênio (VO_2) foi continuamente medido a cada ciclo respiratório por um analisador de gases computadorizado (MGC – CPX/D). O VO_2 pico foi estabelecido pelo valor mais alto obtido durante o esforço em médias de 30 segundos.

4.8.2 Índice tornozelo-braquial

O ITB foi determinado com auxílio de Doppler vascular. As PAS das artérias braquiais e pediosas/tibiais foram medidas bilateralmente. As pressões arteriais foram medidas simultaneamente por dois avaliadores treinados para essas coletas. Para as medidas, os indivíduos deveriam permanecer deitados, em decúbito dorsal. O índice foi calculado para cada membro inferior,

utilizando-se a maior PAS dos braços como denominador e a menor pressão de tornozelo como numerador.

4.8.3 Fluxo sanguíneo basal e primeira onda do fluxo após hiperemia reativa à isquemia

O fluxo sanguíneo da musculatura ativa (perna) foi medido pela técnica de pletismografia de oclusão venosa (Wilkinson & Webb, 2001). Para tanto, o fluxo foi medido na perna com maior obstrução (menor ITB). As medidas de fluxo arterial muscular da perna foram realizadas enquanto o fluxo arterial para o pé estava ocluído pelo manguito colocado em torno do tornozelo, e inflado com uma pressão de 200 mmHg. Para as medidas, foi colocado um manguito na coxa (2 cm abaixo da dobra do joelho), que foi inflado rapidamente (E20 Rapid Cuff Inflator, AG101 Air Source) em níveis sub diastólicos, mas um pouco acima da pressão venosa (40 a 60mmHg) para ocluir o retorno venoso. Esta inflação foi mantida por 10 segundos e foi seguida de 10 segundos de deflação, completando ciclos de 20 segundos cada. Os aumentos do volume da perna foram percebidos por sensores “mercury-in-silastic strain gauges” (Hokanson, AI-6) posicionados na maior circunferência da perna. A medida de repouso foi realizada por 4 min, totalizando 12 medidas. Foi calculado a média dos 10 ciclos, eliminando-se o primeiro e o último, o que foi usado para determinar o fluxo sanguíneo.

Foi avaliado também a hiperemia reativa pico definida como primeira onda do fluxo imediatamente após a técnica de hiperemia reativa à isquemia. Para esta avaliação, após a medida do fluxo sanguíneo basal, o manguito posicionado acima do joelho foi insuflado rapidamente até 200 mmHg e essa oclusão foi mantida por 5 min. Durante o último minuto de oclusão arterial, o

paciente realizou movimentos com os pés, para potencializar o efeito da isquemia sobre o endotélio. Em seguida, o manguito foi desinflado e foi registrado o fluxo sanguíneo da perna por 4 min, com a técnica descrita no registro basal e foi utilizado a primeira onda do fluxo sanguíneo como resultado. Os resultados são expressos em ml de sangue.100 ml tecido⁻¹.min⁻¹.

4.9 Análises moleculares e bioquímicas

4.9.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído do sangue total dos pacientes, coletado em tubos PAXgene™ Blood RNA System (Sistema de Colheita de RNA no Sangue), este é constituído por um tubo de colheita de sangue (PAXgene™ Blood RNA Tube) e um kit de purificação de ácidos nucleicos (PAXgene™ Blood RNA Kit) específico para extração do RNA. Este RNA foi utilizado para a realização do *microarray de microRNAs*, para a confirmação dos miRNAs e quantificação da expressão dos seus alvos por PCR em tempo real.

4.9.2 Microarray de microRNAs

A plataforma de microarray foi realizada baseado no sistema miRBase Versão 17.0, com *chip* 3.0. Foi utilizado amostras de RNA total de amostras sanguíneas de todas as coletas da sessão experimental de 3 pacientes. O experimento foi realizado com os kits da companhia AFFYMETRIX, possibilitando assim a determinação de um perfil de expressão dos miRNAs na corrente sanguínea desses pacientes.

Nessa técnica, foi feito inicialmente o anelamento da cauda Poli-A no RNA total seguido da ligação com DNA marcado com biotina. Após essa primeira parte do experimento, fomos testar através do ensaio de ELOSA se esse anelamento e a ligação da biotina funcionaram.

Após esses testes nas amostras de RNA, a hibridização foi realizada por incubação dos *chips*, overnight, 50°C, sob agitação. No *chip*, cada probe consiste de um nucleotídeo modificado quimicamente que codifica segmentos complementares ao miRNA alvo e um segmento espaçador de propilnoglícol para estender o segmento codificante a partir do substrato. Após a hibridização, os *chips* foram submetidos a estação de lavagem para posterior detecção de fluoróforos específicos para cada amostra. As detecções das imagens foram feitas utilizando um scanner laser (Affimetrix).

Os dados gerados foram analisados primeiramente subtraindo o *background* e então normalizando os sinais para balancear as intensidades dos fluoróforos de forma que a razão da expressão diferencial pudesse ser calculada. Para isso foram utilizados os *softwares Expression Console* para o controle de qualidade e normalização dos chips e o *Transcriptome Analysis Console* para se obter os valores de expressão (expressos em Log₂) e análise estatística.

4.9.3 Expressão gênica

Foi analisado a expressão gênica dos c-miRNAs -620 (INV479104), -199b-3p (477961) (Applied Biosystems), os quais apresentaram expressão alterada pela NAC, após a realização do exercício aeróbico máximo, quando avaliado pela análise de *microarray de microRNAs* das amostras de sangue total dos pacientes com DAP. Ainda, foi analisado a expressão dos c-miRNAs -126 (INV 2228), -100 (INV 2142) e -92a (INV477827) (Applied Biosystems), por serem miRNAs importantes no processo de angiogênese e isquemia. Além disso, foi analisado a expressão gênica dos alvos desses miRNAs.

- *Síntese do cDNA do RNAm dos alvos dos miRNAs*

Para conversão de RNA em cDNA foi utilizado $1\mu\text{g. mL}^{-1}$ de RNA total, $1\mu\text{L}$ de dNTP mix 10nM , $1\mu\text{L}$ de random hexamers ($50\text{ ng. }\mu\text{L}^{-1}$) e $8\mu\text{L}$ de H_2O DEPC, de acordo com o fabricante (Invitrogen, Brasil).

- *Síntese do cDNA dos RNAs dos miRNAs*

O cDNA para a análise dos miRNAs foram sintetizados a partir do RNA total utilizando *primers* gene-específicos de acordo com o protocolo de ensaio MicroRNA TaqMan (Applied Biosystems). Os $15\ \mu\text{L}$ de reação obtidos do protocolo de transcrição reversa MicroRNA TaqMan (Applied Biosystems) foram incubados em um termociclador por 30 min a 16°C , 30 min a 42°C , 5 min a 85°C e, em seguida foi mantido a 4°C até a sua utilização na montagem do PCR em tempo real.

- *Reação em cadeia da polimerase em tempo real dos alvos dos miRNAs*

O ensaio da análise da expressão gênica dos alvos dos miRNAs foram feitos de acordo com o protocolo descrito por Taqman Gold RT-PCR kit. Nesse ensaio, a primeira fita de cDNA ($1-6\ \mu\text{L}$) foi amplificada em $25\ \mu\text{L}$ de reação contendo $12,5\ \mu\text{L}$ de Taqman transcriptase reversa, 2x da mistura SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) e primers específicos para o gene desejado (900nM). Os *primers* foram desenhados utilizando o *software Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>). Foi utilizado como controle normalizador o gene da ciclofilina.

Os primers utilizados foram: PI3KR2 (sense: 5'CTA CAA CCT GTA CGG GTC GCT GAA GGA G 3', antisense: 5'CTGGATGTGGCTGGTCTGGTCCGT-3'), SPRED-1 (sense: 5' CGT GTG ACA TAG CGA TGA CAA GTT CTG C 3',

antisense: 5' CGA TGG CAC ATT CTC AAA GGG ACG TAG 3'), VEGF (sense: 5' TCT CTC TCT CCC AGA TCG GTG ACA GTC AC 3', antisense: 5' TCA AAG GAA TGT GTG GTG GGG ACA GC 3'), eNOS (sense: 5' CGG GAT CAG CAA CGC TAC CAC GAG 3', antisense: 5' CTG TCG CTC CTG CAA AGA AAA ACT CTG G 3'), HIF-1 α (sense: 5' GAC AAG CCA CCT GAG GAG AG 3', antisense: 5' AGA AGA GAA GGA AAG GCA AGT CC 3'), ITGA5 (sense: 5' TTC TTC AAA CGC TCC CTC CCA TAT GG 3', antisense: 5' CCT TCA AGT ATG TCT CTG GGC TGG GGA 3'), mTOR (sense: 5' TTT GAG CAT GCC GTC AAT AAT ACA G 3', antisense: 5' ATA ATT GGT TCT TCG GTC AAA CCA C 3') ciclofilina (sense: 5'-AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3', antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3').

- *Reação em cadeia da polimerase em tempo real dos microRNAs (real time RT-PCR)*

A fim de confirmar as alterações de expressão gênica dos miRNAs encontrados na técnica de *microarray de microRNA*, foram realizadas análises da expressão gênica dos miRNAs por *PCR em tempo real* de acordo com o protocolo de ensaio descrito por Taqman MicroRNA (Applied Biosystems). Dos 20 μ l de PCR inclui 1.33 μ l produto do RT, 10 μ l de TaqMan Universal PCR master mix II (2 \times), 7.67 μ l de água livre de nuclease e 1 μ l de primers e sonda mix do protocolo de ensaio MicroRNA TaqMan para os miRNAs. Foi utilizado como controle normalizador o gene U6, gene que já é utilizado como normalizador em outros estudos do nosso laboratório (Fernandes et al., 2011; Soci et al., 2011).

Os passos do PCR em tempo real foram os seguintes: 1) desnaturação a 95°C por 10 min para a ativação da enzima AmpliTaq Gold; 2) 45 ciclos a

95°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 1 min (anelamento). As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems).

4.9.4 Avaliação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo na circulação

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina e rapidamente centrifugadas (300 rpm, 10 min, 4°C). O plasma foi então transferido para tubos de microcentrífuga (1.5ml) e armazenados a -80°C até a análise. Os níveis plasmáticos de ET-1, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, 8-isoprostano (R&D system a biotechne brand), TBARS e glutathiona (Cayman Chemical) foram mensurados por meio de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.10 Análise estatística

Para as análises do impacto do tratamento com NAC no tempo de caminhada e nas respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar foi utilizado a análise de teste T de Student pareado.

Para a análise do *microarray de microRNA* foi utilizado a análise de teste T de *Student* pareado para comparação entre os valores após exercício entre as sessões Droga e Placebo e foi utilizado a análise de variância ANOVA de uma via de medidas repetidas para as análises entre os tempos das sessões experimentais com Placebo e com Droga.

Os dados de expressão gênica dos miRNAs e de seus alvos, além dos dados dos marcadores inflamatórios e estresse oxidativo foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias de medidas repetidas.

Quando encontrado diferenças significativas na análise de variância ANOVA foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey (Statistica software, StatSoft,

Inc.). Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados serão apresentados na forma de média \pm erro padrão.

5. RESULTADOS

No presente estudo foram obtidos os resultados referentes aos testes de familiarização, tempo de teste na distância inicial de claudicação e na distância máxima de caminhada e o impacto do tratamento com NAC na sessão aguda de exercício aeróbico máximo nas seguintes variáveis: nas respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar, fluxo sanguíneo basal e hiperemia reativa pico, marcadores de estresse oxidativo no plasma (glutathiona, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, 8-isoprostano) e marcadores inflamatórios no plasma (ET-1, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1).

Em relação à análise dos miRNAs, foi realizado a expressão gênica de c-miRNAs pela técnica de *microarray* e a confirmação gênica dos miRNAs - 620 e -199b-3p. Além disso, foi realizado a expressão gênica dos miRNAs - 126, 92a, -100 por serem relacionados com angiogênese e de alvos específicos desses miRNAs.

5.1 Características demográficas

Os pacientes com DAP do sexo masculino foram recrutados do Ambulatório de CI do Hospital das Clínicas da USP. Como dito anteriormente, ao todo, treze pacientes foram incluídos no estudo, porém, após exclusões o estudo está sendo desenvolvido com 10 pacientes. As características demográficas e clínicas dos 10 pacientes, que finalizaram todo o protocolo experimental estão delineadas na tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas dos pacientes com DAP.

No.	10
Idade, anos	62±2
Peso corporal, Kg	72±3
Índice de massa corpórea, Kg/m ²	26±1
ITB (perna mais afetada)	0,49±0,04
ITB (perna menos afetada)	0,65±0,07
Raça, % Brancos	60
Fumantes, %	60
Diabetes mellitus, %	40
Medicação, (%)	
Ácido acetilsalicílico	80
Estatinas	80
Agentes anti-hipertensivos	
β-bloqueador	10
Diuréticos	70
Bloqueador de canais de cálcio	40
Inibidor da ECA	50
Antagonista do receptor de angiotensina II	20
Inibidores da xantina oxidase	20
Metformina	40

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão ou porcentagem. ITB: índice tornozelo-braquial, ECA: Enzima conversora da angiotensina I.

5.2 Testes de familiarização

Antes de iniciar o protocolo experimental, os pacientes realizaram dois testes de familiarização com exercício em esteira rolante. Conforme demonstrado abaixo (Figura 4), não houve diferença significativa entre os testes no que se refere ao tempo de caminhada sem dor e até a exaustão. Além disso, a reprodutibilidade para determinação do tempo de caminhada até o início da dor (coeficiente de correlação intraclasse: $R=0.76$) e para a o tempo até a exaustão (coeficiente de correlação intraclasse: $R=0.98$) foram excelentes.

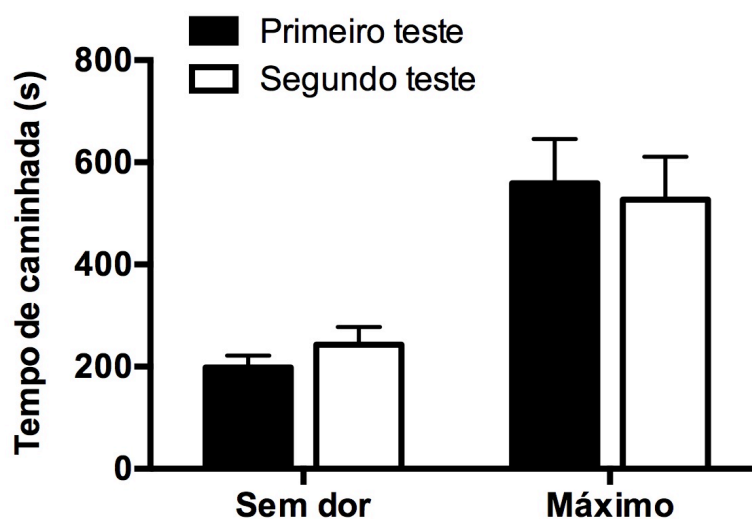


Figura 4: Tempo de caminhada sem dor e máximo durante os testes de familiarização com o teste incremental em esteira rolante.

5.3 Impacto do tratamento com NAC no tempo de caminhada na sessão aguda de exercício aeróbico máximo

O impacto do tratamento com NAC sobre o tempo de caminhada nos pacientes com DAP está demonstrado na Figura 5. Não houve diferença entre os dois tratamentos (NAC/Placebo) no tempo até o início da dor (Placebo: 294 ± 49 vs. NAC: 299 ± 45 s, $p=0.86$) e até a exaustão (Placebo: 606 ± 73 vs. NAC: 588 ± 75 s, $p=0.59$) durante a realização do exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP (Figura 5).

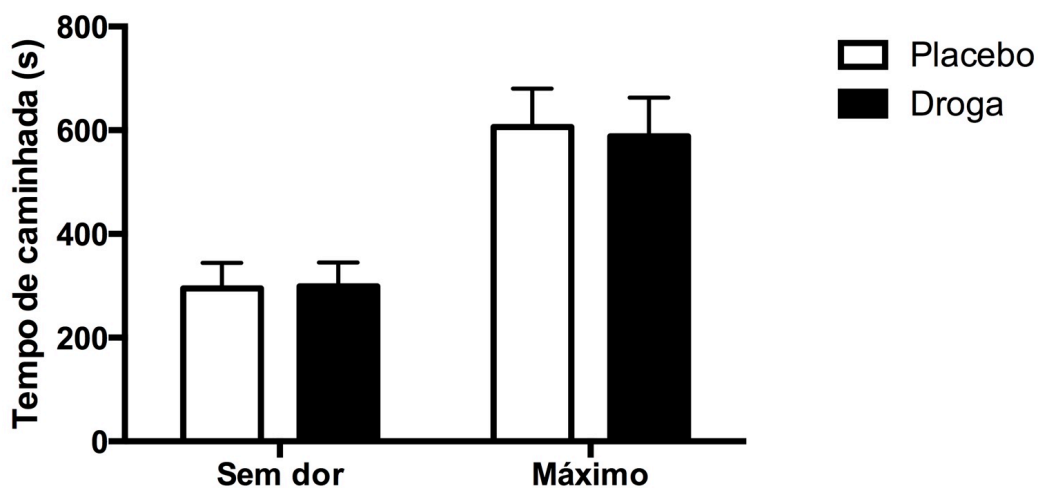


Figura 5: Tempo de caminhada até o início da dor e tempo máximo após o tratamento com placebo ou NAC.

5.4 Impacto do tratamento com NAC nas respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar na sessão aguda de exercício aeróbico máximo

O impacto do tratamento com NAC sobre o VO₂ Pico, frequência cardíaca máxima, PAS, PAD e ITB dos pacientes com DAP na sessão aguda de exercício máximo estão apresentados na tabela 2. Nenhum dos parâmetros analisados sofreram impacto significativo do tratamento com NAC em repouso e após a realização do exercício aeróbico máximo.

Tabela 2 – Respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar a sessão aguda de exercício aeróbico máximo.

	PLACEBO	NAC
VO ₂ Pico (ml.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	14,8±1,1	15,1±1,1
FC Máxima (bpm)	112±6	113±6
PAS (mmHg)		
Repouso	127±5	129±7
Pico	174±9	171±11
PAD (mmHg)		
Repouso	73±4	74±4
Pico	80±6	81±4
Pressão Tornozelo (mmHg)		
Repouso	78±6	83±6
5 min após o teste máximo	62±5	61±11

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. VO₂ Pico = consumo de oxigênio no pico do exercício; FC = frequência cardíaca; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica.

5.5 Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo basal e na hiperemia reativa pico em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Tabela 3 apresenta os resultados referente ao impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo basal e na hiperemia reativa pico da perna em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP. Conforme mostrado na tabela abaixo, o fluxo sanguíneo basal da perna foi maior após o exercício aeróbico máximo, mas não sofreu nenhum impacto do tratamento com NAC. Entretanto, a hiperemia reativa pico da perna não foi significativamente diferente após o exercício aeróbico máximo e também não sofreu nenhum impacto do tratamento com NAC.

Tabela 3 - Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo basal e na hiperemia reativa pico da perna em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo em pacientes com DAP.

	Placebo	NAC	p	
Fluxo basal (ml sangue.100 ml tecido ⁻¹ .min ⁻¹)			Sessão	0,90
Repouso	1,23±0,14	1,19±0,15	Estágio	0,00
Após exercício	1,74±0,41*	1,81±0,55 *	Interação	0,21
1ª Onda (ml sangue.100ml tecido ⁻¹ .min ⁻¹)			Sessão	0,33
Repouso	4,01±0,75	4,81±0,99	Estágio	0,61
Após exercício	5,52±1,03	4,84±1,53	Interação	0,14

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão. 1ª Onda = hiperemia reativa pico. * p < 0,05 vs Fluxo em repouso.

5.6 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores inflamatórios em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura abaixo (Figura 6) nos mostra os resultados referentes ao impacto do tratamento com NAC na concentração plasmática de MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 e ET-1 em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo, 5 e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

Como podemos observar o exercício aeróbico máximo promoveu elevação nos níveis plasmáticos de MCP-1 e VCAM-1 (5 min pós -exercício) ($p < 0,05$), entretanto esses níveis não permaneceram elevados 30 min após – exercício. Os níveis plasmáticos de ET-1 foram superiores imediatamente (5 min pós-exercício) e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$). Os níveis plasmáticos de ICAM-1 e PCR não foram alterados com o exercício aeróbico máximo. Entretanto, o tratamento com NAC não promoveu nenhuma modificação nos níveis plasmáticos de nenhum marcador inflamatório.

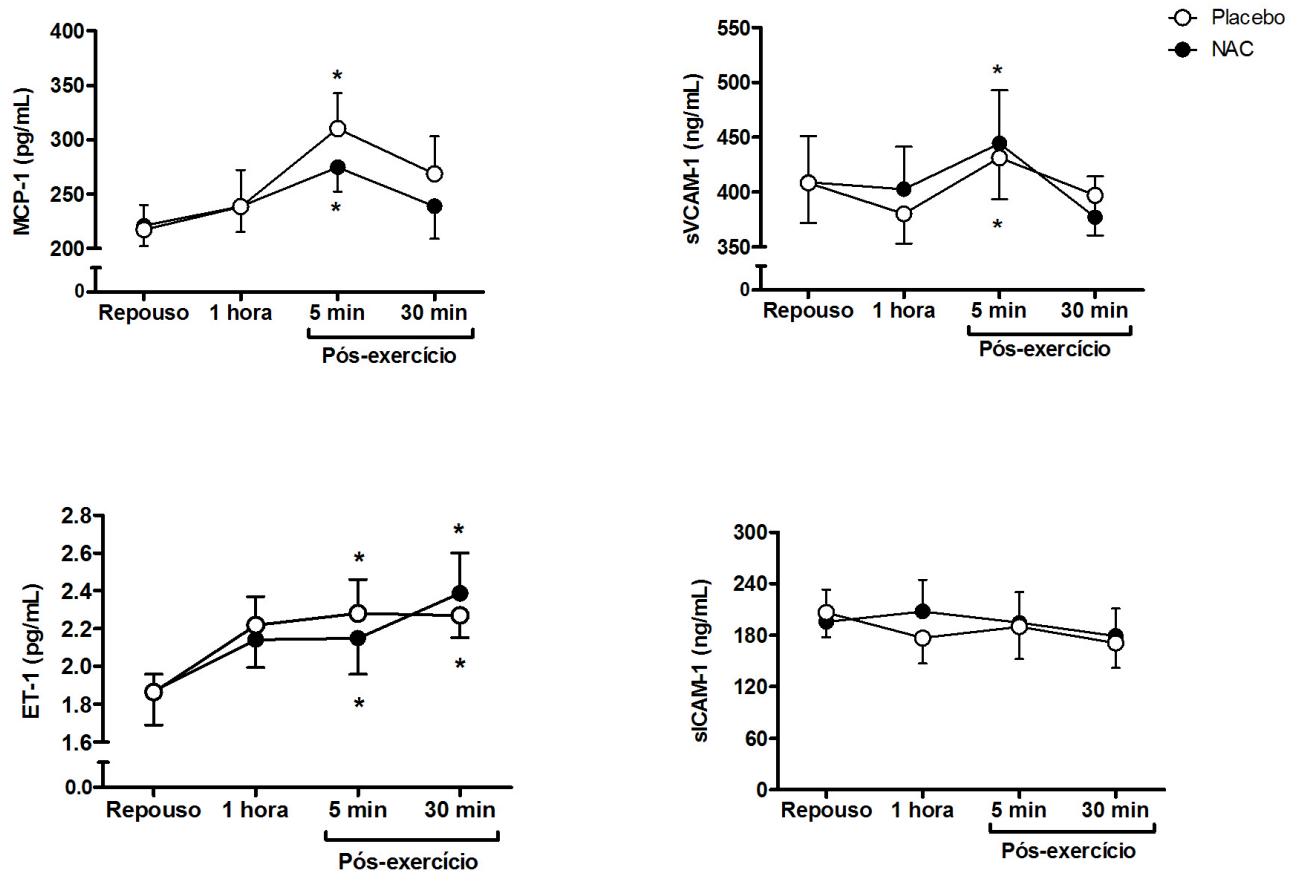


Figura 6: Concentração plasmática de MCP-1, sVCAM-1, ET-1 e sICAM-1 no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 5 e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, ($p < 0.05$).

5.7 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de estresse oxidativo plasmático em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura 7 representa os resultados referentes ao impacto do tratamento da NAC na concentração plasmática de glutathiona (razão GSH/GSSG), TBARS e 8-isoprostano em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo, 5 e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

O exercício aeróbico máximo promoveu alterações nos níveis plasmáticos do TBARS ($p < 0,05$), mas não nos níveis plasmáticos de Glutathiona e 8-isoprostano. O tratamento prévio com NAC não promoveu nenhuma modificação nos níveis plasmáticos da glutathiona, observado no período repouso. Entretanto, 1 hora após a ingestão de NAC, observou-se maiores níveis plasmáticos de glutathiona quando comparado ao repouso e a sessão com tratamento de placebo. Além disso, esses níveis se mantiveram elevados 5 e 30 minutos após o exercício máximo tanto quando comparado aos níveis de repouso e quando comparado aos níveis de glutathiona na sessão com tratamento de placebo ($p < 0,05$). Nas outras variáveis de estresse oxidativo estudada (TBARS e 8-isoprostano), o tratamento com NAC não promoveu nenhuma alteração.

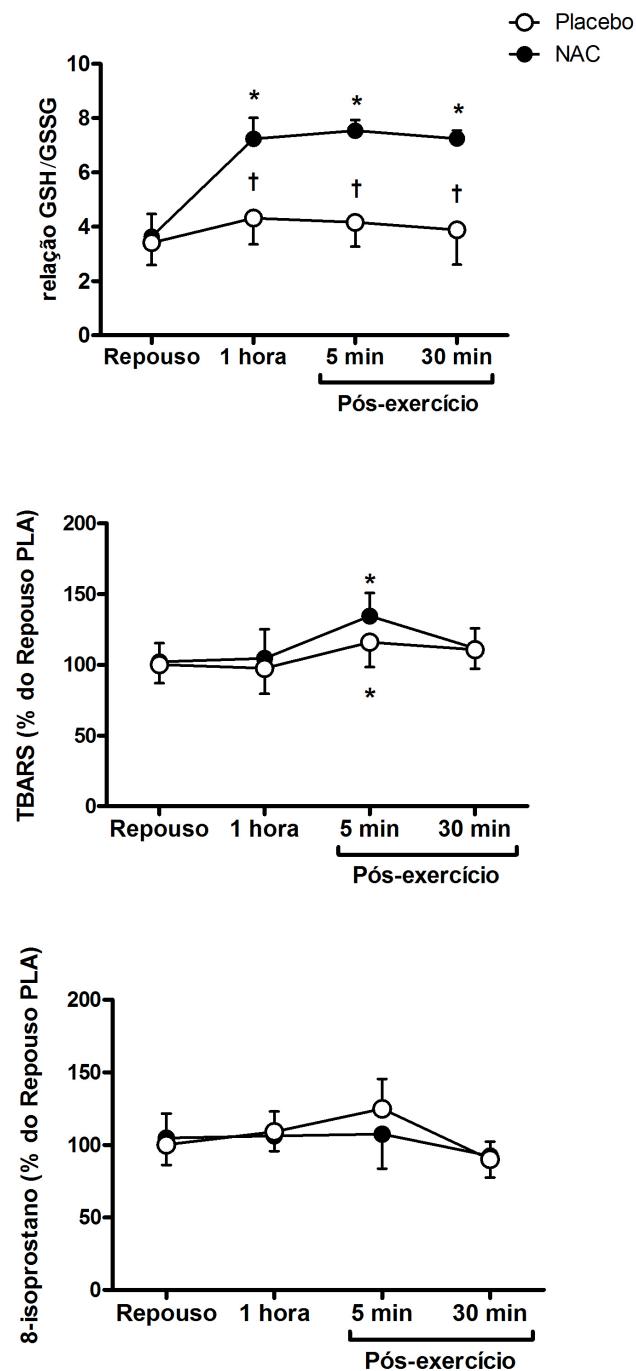


Figura 7: Concentração plasmática da glutathiona representada pela razão entre GSH/GSSG, TBARS (% do repouso placebo) e 8-isoprostano (% do repouso placebo) no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo, e 5 e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso; † diferença vs Placebo, ($p < 0.05$).

5.8 Microarray de microRNA

Para a análise do perfil de expressão dos c-miRNAs dos pacientes com DAP, primeiramente realizamos a expressão gênica dos miRNAs pela técnica de *microarray de microRNAs*.

Os resultados serão apresentados separadamente para sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem e com uso de NAC, além da comparação da amostra coletada após a realização do exercício aeróbico máximo entre as duas sessões experientes realizadas pelos pacientes com DAP.

5.8.1 Resultado da expressão diferencial de microRNAs da sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem o uso de NAC

Para essa análise foram selecionados os c-miRNAs com expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo comparado aos dois momentos coletados anteriores a realização do exercício com intuito de identificar miRNAs que participam dos efeitos agudos do exercício aeróbico máximo em pacientes com DAP.

Primeiramente foi realizada uma seleção considerando uma diferença de expressão dos c-miRNAs após a realização do exercício aeróbico máximo quando comparado aos outros 2 momentos e com $p < 0,05$, resultado apresentado na Figura 8. De acordo com essa análise, 78 c-miRNAs tiveram sua expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo quando comparado aos outros dois momentos.

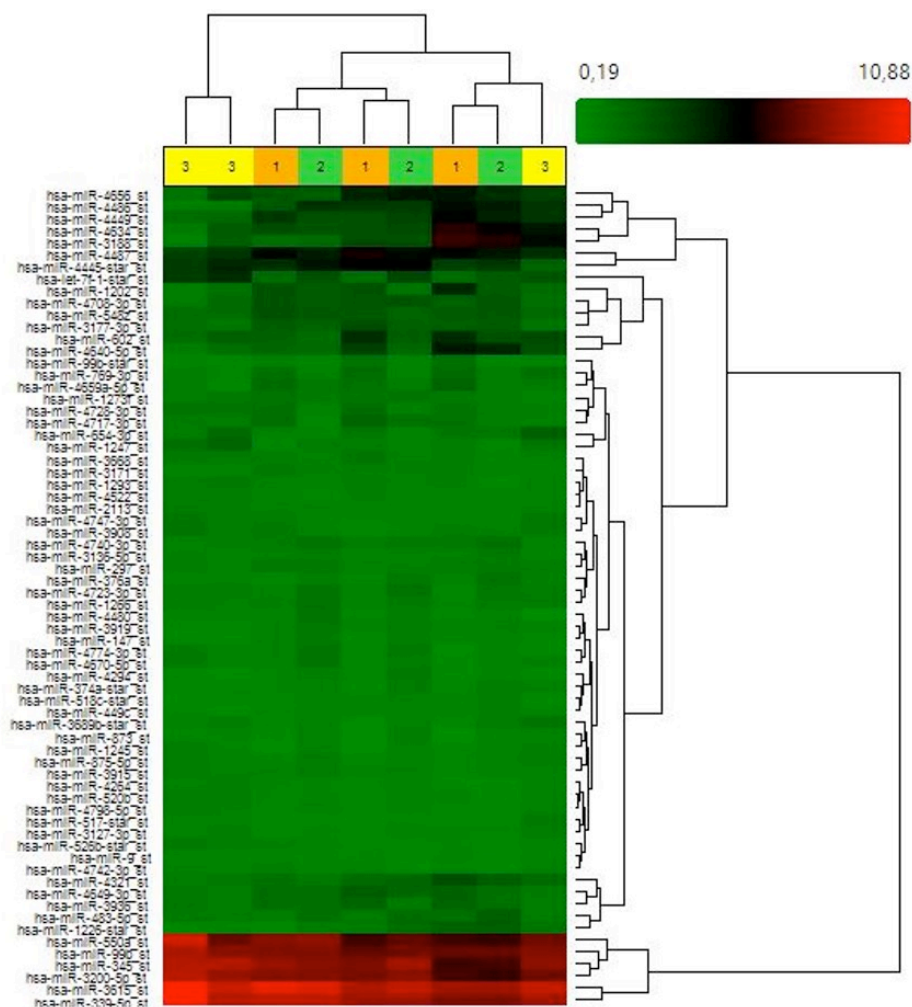


Figura 8 – Heatmap dos miRNAs diferentemente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP submetidos a sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem uso de NAC. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log₂. Diferença significativa com $p < 0,05$.

Após essa primeira análise, realizamos uma segunda seleção de miRNAs, na qual foram selecionados c-miRNAs que tiveram sua expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo quando comparado ao repouso com uma significância com $p < 0,01$ (Figura 9). Como observado nos gráficos abaixo, 8 c-miRNAs (hsa-miR-1248, -4767, -493, -376a, -875-5p, -4656, -3652, -548ac) apresentaram esse perfil de alteração.

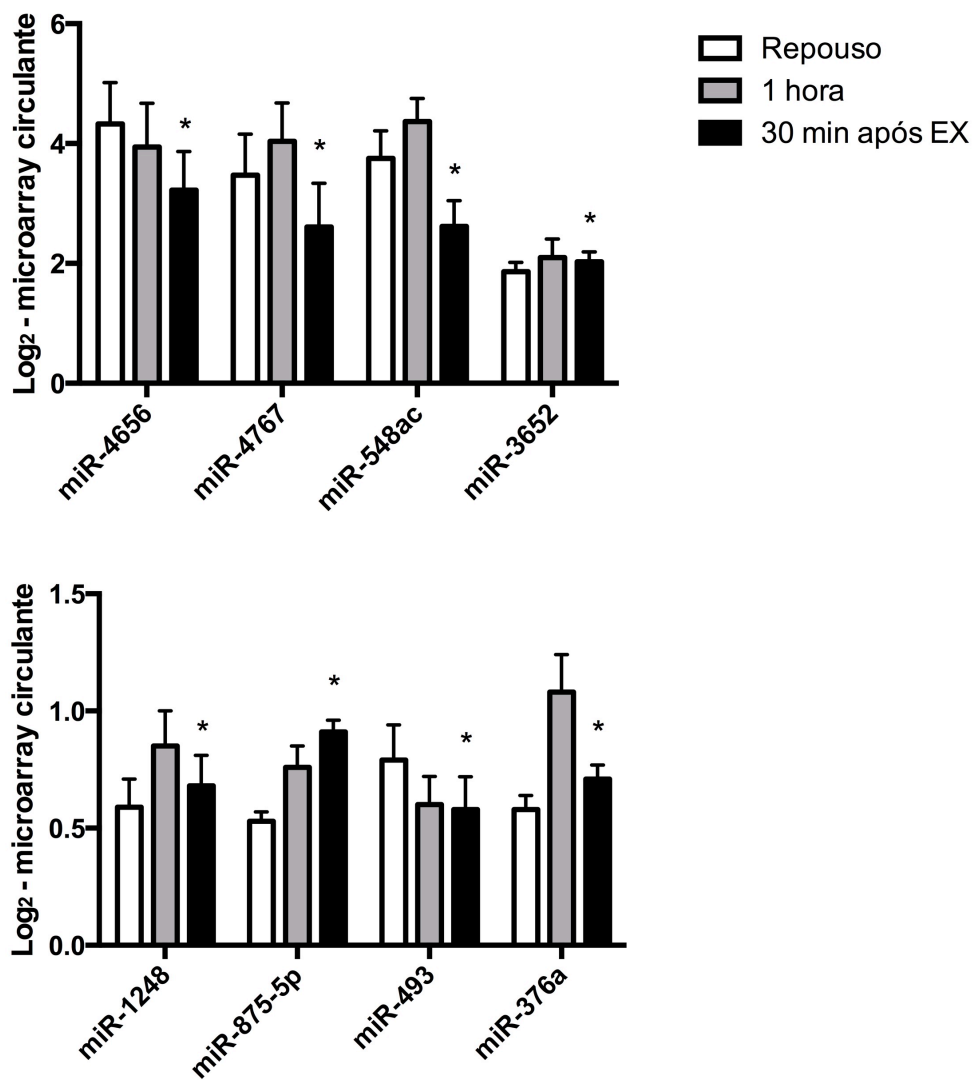


Figura 9 – Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP após a sessão aguda de exercício aeróbico máximo sem uso de NAC. Resultado expresso em Log₂. * p < 0,01 vs repouso.

5.8.2 Resultado da expressão diferencial de microRNAs da sessão aguda de exercício aeróbico máximo com uso de NAC

Para essa análise foram selecionados os c-miRNAs que tiveram sua expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo comparado aos dois momentos anteriores a realização do exercício no período em que os pacientes estavam em uso de NAC. O objetivo dessa análise é identificar o papel da NAC na alteração de expressão de c-miRNAs e a associação dos efeitos agudos do exercício aeróbico máximo e do uso de NAC em pacientes com DAP.

Para isso, utilizamos o mesmo critério utilizado na análise do item anterior. Selecionamos os c-miRNAs que apresentaram uma diferença de expressão após o exercício aeróbico máximo quando comparado aos outros 2 momentos com $p < 0,05$. Dessa forma, obtivemos 53 c-miRNAs que tiveram expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo com uso da NAC, quando comparado os outros dois momentos (Figura 10).

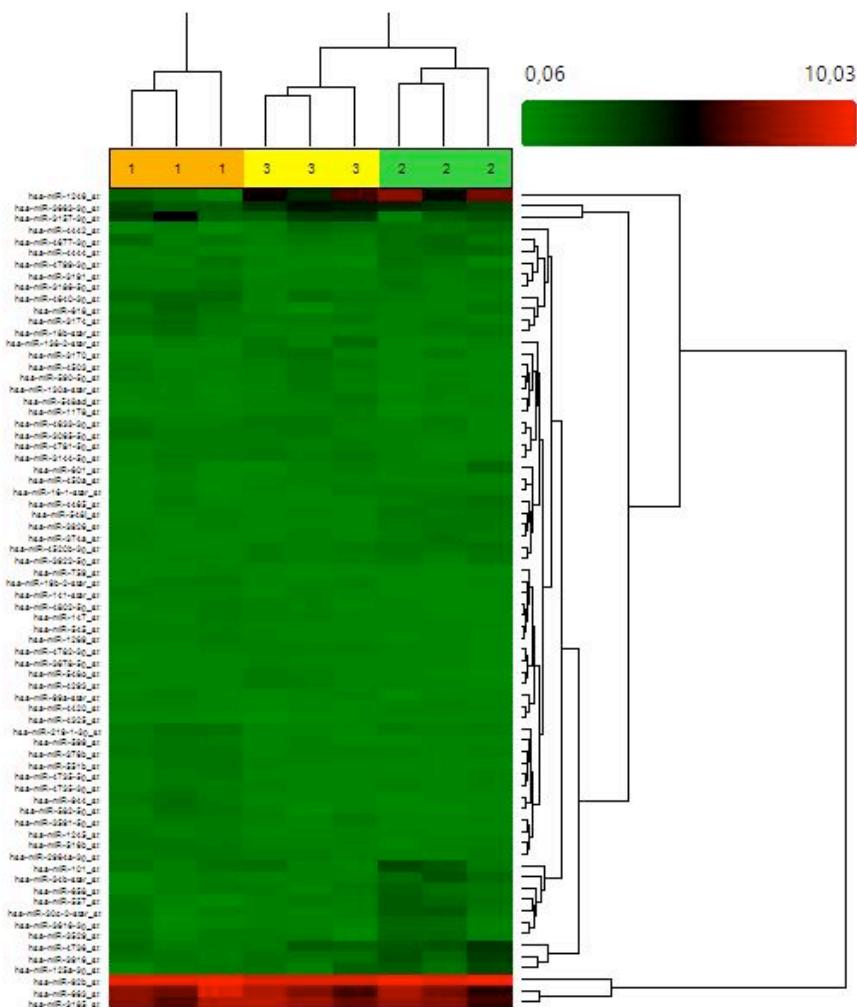


Figura 10 – Heatmap dos miRNAs diferentemente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP submetidos a sessão aguda de exercício aeróbico máximo, com uso de NAC. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log₂. Diferença significativa com $p < 0,05$.

Após essa primeira análise, realizamos uma segunda seleção de c-miRNAs, na qual foram selecionados c-miRNAs que tiveram expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo com uso de NAC quando comparado a 1 hora após a ingestão da NAC com $p < 0,01$ (Figura 11). Essa comparação foi realizada (Pós x 1 hora) devido ao efeito da ingestão da NAC no dia da sessão experimental nos níveis plasmáticos de glutathiona.

Como observado na figura abaixo, 12 c-miRNAs (hsa-miR-3124-3p, -129, -20b, -1825, -1197, -4691, -630, -374a, -548, -4444, -3065-5p, -3144-5p) apresentaram esse perfil de alteração.

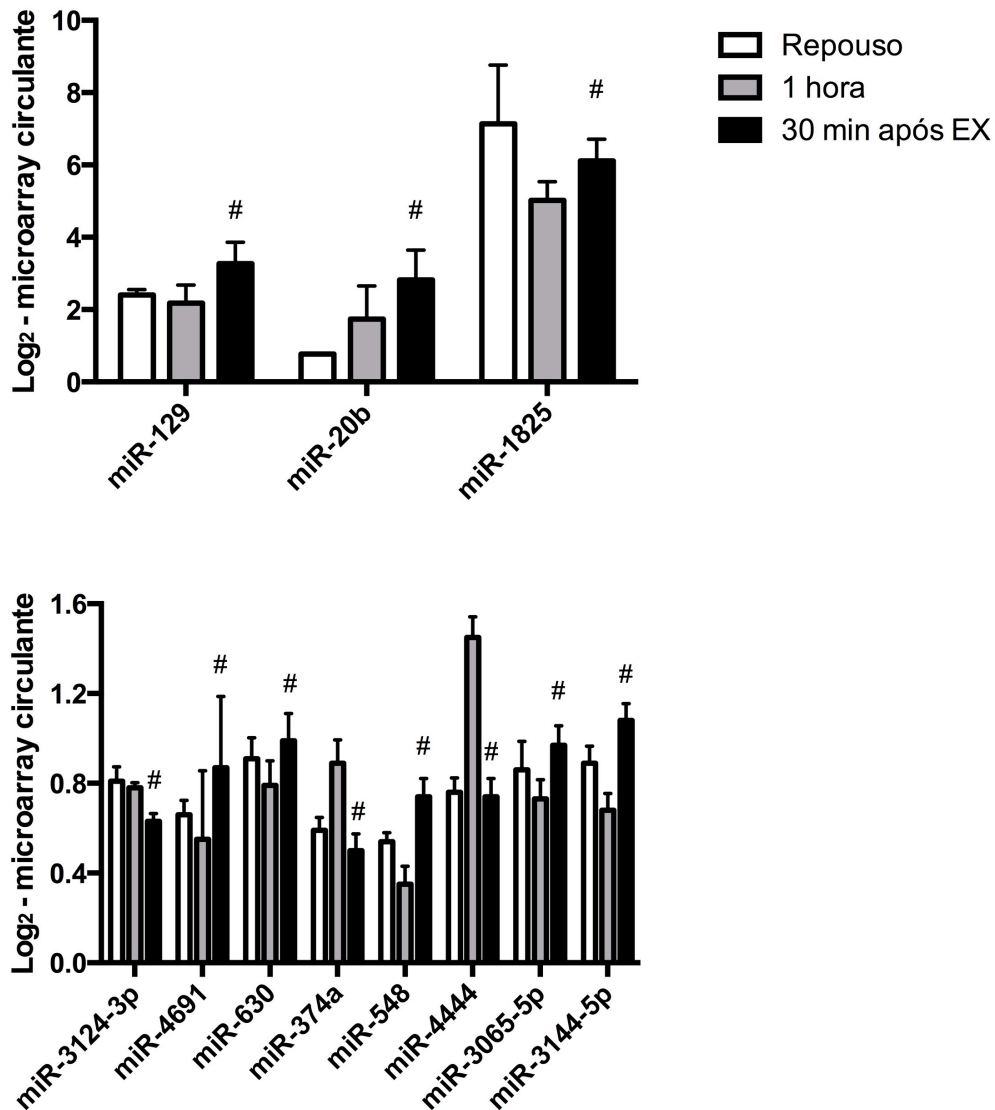


Figura 11 – Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP após a sessão aguda de exercício aeróbico máximo com uso de NAC. Resultado expresso em Log₂. # p < 0,01 vs 1 hora.

5.8.3 Resultado da comparação da expressão diferencial de microRNAs após uma sessão aguda de exercício aeróbico máximo com e sem uso de NAC

Após essas primeiras comparações isoladas (sessão aguda de exercício máximo sem e com uso de NAC), não encontramos nenhum c-miRNA que aparecesse com um padrão de expressão inversa ou adicional após o exercício quando comparado as duas análises. Devido a isso, comparamos somente o momento após o exercício aeróbico máximo (30min após ex) entre as duas sessões experimentais com o intuito de verificarmos se encontramos algum efeito adicional ou inverso com o uso da NAC no exercício aeróbico máximo.

Da mesma forma, utilizamos os mesmos critérios das análises anteriores. Selecionamos os c-miRNAs que apresentaram uma diferença entre as sessões experimentais com $p < 0,05$. Assim, como demonstrado na Figura 12, 64 c-miRNAs apresentaram expressão diferente entre as duas sessões experimentais.

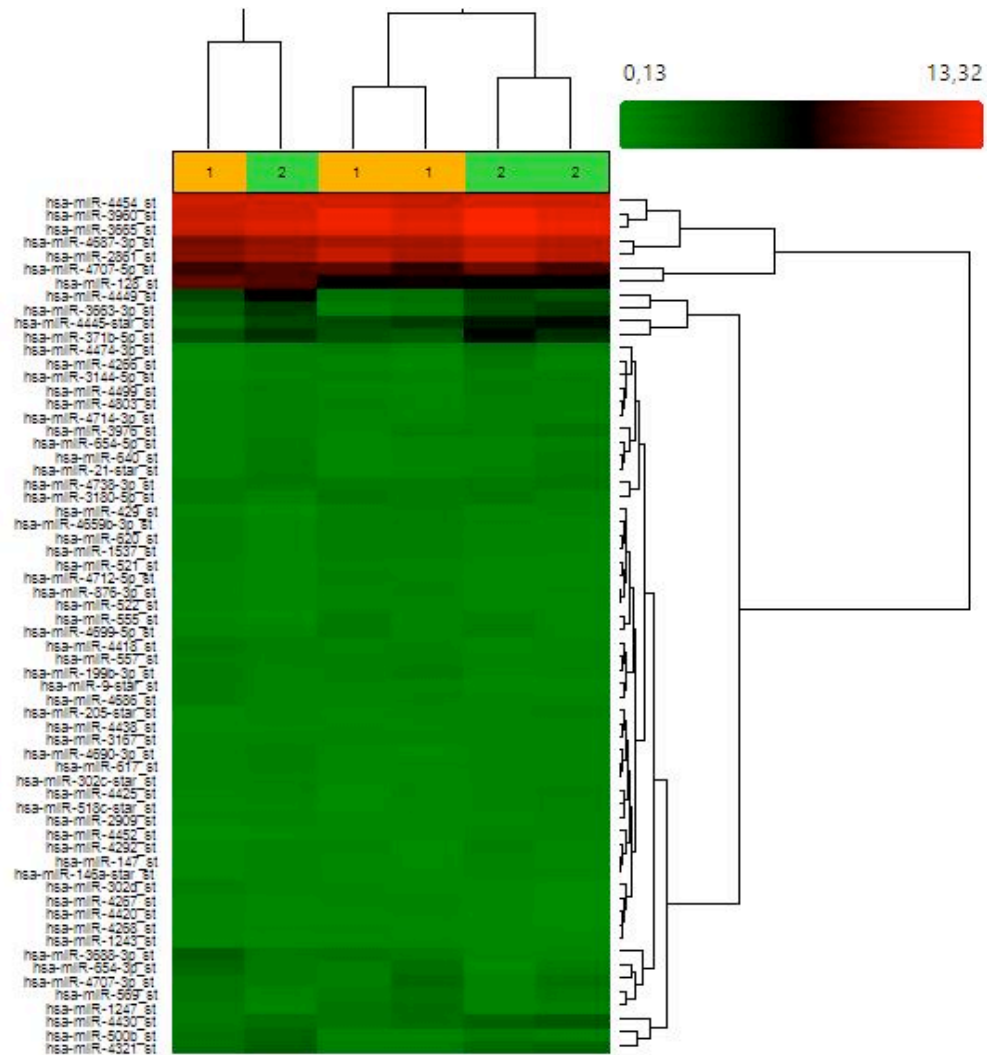


Figura 12 – *Heatmap* dos miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP, no momento após exercício aeróbico máximo em ambas sessões experimentais. 1 = Repouso, 2 = 1 hora após ingestão Placebo/Droga, 3 = 30 min após exercício. Resultado expresso em Log_2 . Diferença significativa com $p < 0,05$.

Após essa primeira análise, realizamos uma segunda seleção de c-miRNAs, onde selecionamos c-miRNAs que tiveram expressão diferente entre as sessões experimentais com $p < 0,01$ (Figura 13). Como observado abaixo, 6 c-miRNAs (hsa-miR-620, -4445, -4268, -3960, -199b-3p, -4707-5p)

comportaram-se diferentes após a realização do exercício aeróbico máximo com e sem uso da NAC.

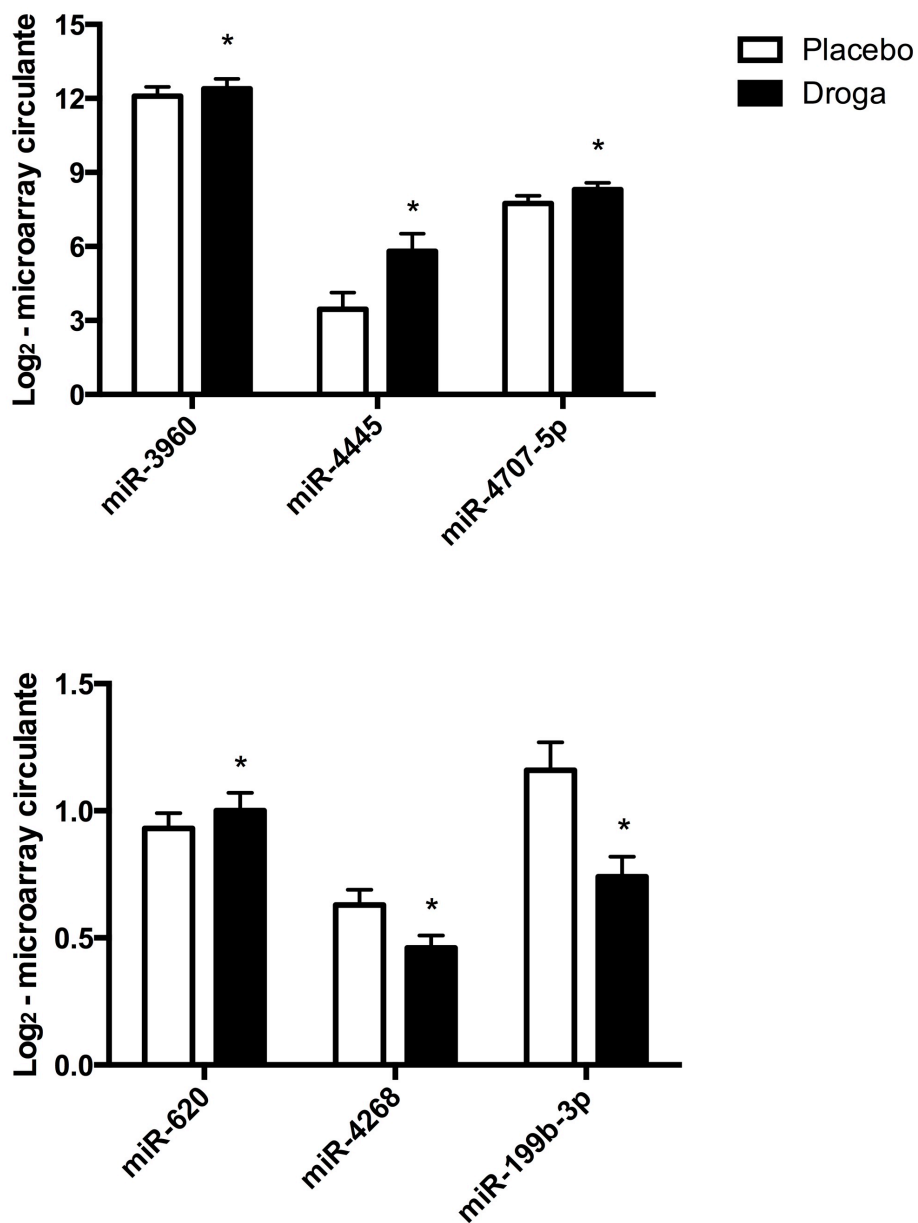


Figura 13 – Expressão de miRNAs diferencialmente expressos na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais após a realização do exercício aeróbico máximo. Resultado expresso em Log₂. * $p < 0,01$ vs sessão experimental com uso de Placebo.

5.8.4 Estudo de predição *in silico* dos alvos dos microRNAs que foram alterados pela NAC após a realização do exercício aeróbico máximo

Após essas análises do *microarray* dos c-miRNAs dos pacientes com DAP, verificou-se por análise *in silico* os possíveis alvos dos c-miRNAs alterados pela NAC após a realização do exercício aeróbico máximo. Para isso, utilizamos o site de pesquisa bioinformática miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/mirretsys.php>) pois nesse site é possível verificar a lista de predição de diversos sites de pesquisa bioinformática simultaneamente, como TargetScan, miRanda, miRbase, Diana, do próprio miRWalk, entre outros. Para a análise, utilizamos os 5 sites citados acima e consideramos como possíveis alvos dos miRNAs pesquisados apenas os genes que apareceram como alvo em pelo menos 3 desses sites utilizados.

No período em que foi realizado o estudo de predição os miRs -620 e -199b-3p possuíam genes-alvos para humanos, porém, os miRs -4445, -4268, -3960 e -4707-5p ainda não possuíam nenhum alvo predito nos sites de predição de alvos de miRNAs utilizados.

Após essa análise, realizamos um cruzamento de todos os genes alvos preditos desses 2 miRNAs utilizando o site de pesquisa de bioinformática (DAVID - <https://david.ncifcrf.gov>) para verificarmos em quais vias de sinalização os genes-alvos desses miRNAs estão presentes. Encontramos que esses 2 miRNAs possuem alvos preditos em 13 vias de sinalização em humanos descritas na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 – Vias de sinalização em que os miRNAs -620 e 199b-3p possuem genes-alvos preditos.

miRNA	Via de sinalização	P-valor / FDR
miR-620, -199b-3p	Endocitose	0,001 / 0,047
miR-620, -199b-3p	MAPKs	0,001 / 0,096
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização Wnt	0,001 / 0,276
miR-620, -199b-3p	Vias de sinalização em câncer	0,001 / 0,572
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização GnRH	0,001 / 1,628
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização Hedgehog	0,002 / 3,193
miR-620, -199b-3p	Junção Adherens	0,003 / 4,092
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização fosfatidilinositol	0,007 / 8,401
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização PPAR	0,01 / 13,763
miR-620, -199b-3p	Via de sinalização de cálcio	0,01 / 19,395
miR-620, -199b-3p	Cardiomiopatia dilatada	0,03 / 33,54
miR-620, -199b-3p	Câncer pancreático	0,04 / 39,179
miR-620, -199b-3p	Fagocitose FC gama mediada	0,04 / 39,502

Além disso, buscou-se de alvos relacionados com angiogênese, inflamação e estresse oxidativo, pelo fato de que esses mecanismos estão relacionados com a fisiopatologia da doença arterial periférica (TABELA 5).

Tabela 5 – Estudo de predição *in silico* dos alvos dos miRNAs que foram alterados pela NAC após a realização do exercício aeróbico máximo

microRNAs	Genes-alvos	Número de sites de bioinformática
miR-620	pi3kr2, sod2	(3,3)
miR-199b-3p	mTOR, spred-1, IL15	(4,3,3)

5.9 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante dos miRNAs selecionados a partir do *microarray* de microRNAs

Conforme observado na Figura 14, foi verificado o impacto do tratamento da NAC na expressão gênica circulante do miRNA -199b-3p em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

Como verificado na figura abaixo, o miR-199b-3p não teve sua expressão alterada após a realização do exercício aeróbico máximo. Além disso, o tratamento com NAC também não alterou a expressão do miRNA-199b-3p. Em relação aos resultados do miR -620, outro miRNA selecionado a partir do *microarray de microRNAs*, o miR-620 não foi amplificado na corrente sanguínea dos pacientes com DAP pela técnica de PCR em tempo real.

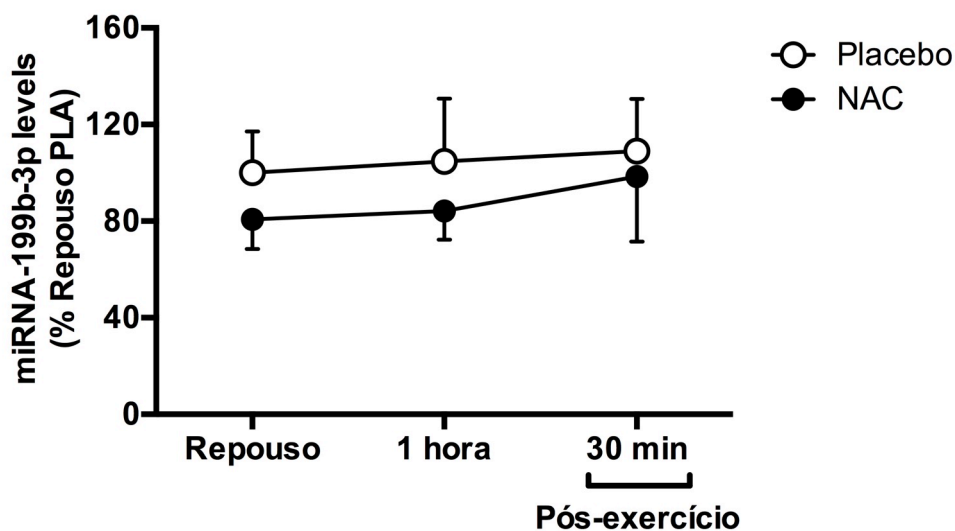


Figura 14 – Expressão do miRNA -199b-3p na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício aeróbico máximo. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

5.10 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante de microRNAs relacionados com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura 15 apresenta os resultados referentes ao impacto do tratamento da NAC na expressão gênica circulantes dos miRNAs -126, -100 e -92a em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

Como podemos observar na Figura abaixo, o miR-126 teve sua expressão aumentada após a realização do exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$), porém, o tratamento com NAC foi capaz de abolir o efeito desse exercício. O miR-100 também teve sua expressão aumentada após a realização do exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$), entretanto, o tratamento com NAC promoveu níveis aumentados desse miRNA durante toda a sessão experimental ($p < 0,05$). O miR-92a teve sua expressão diminuída após a realização do exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$). Contudo, o tratamento com NAC associado ao exercício promoveu um aumento da expressão desse miRNA ($p < 0,05$).

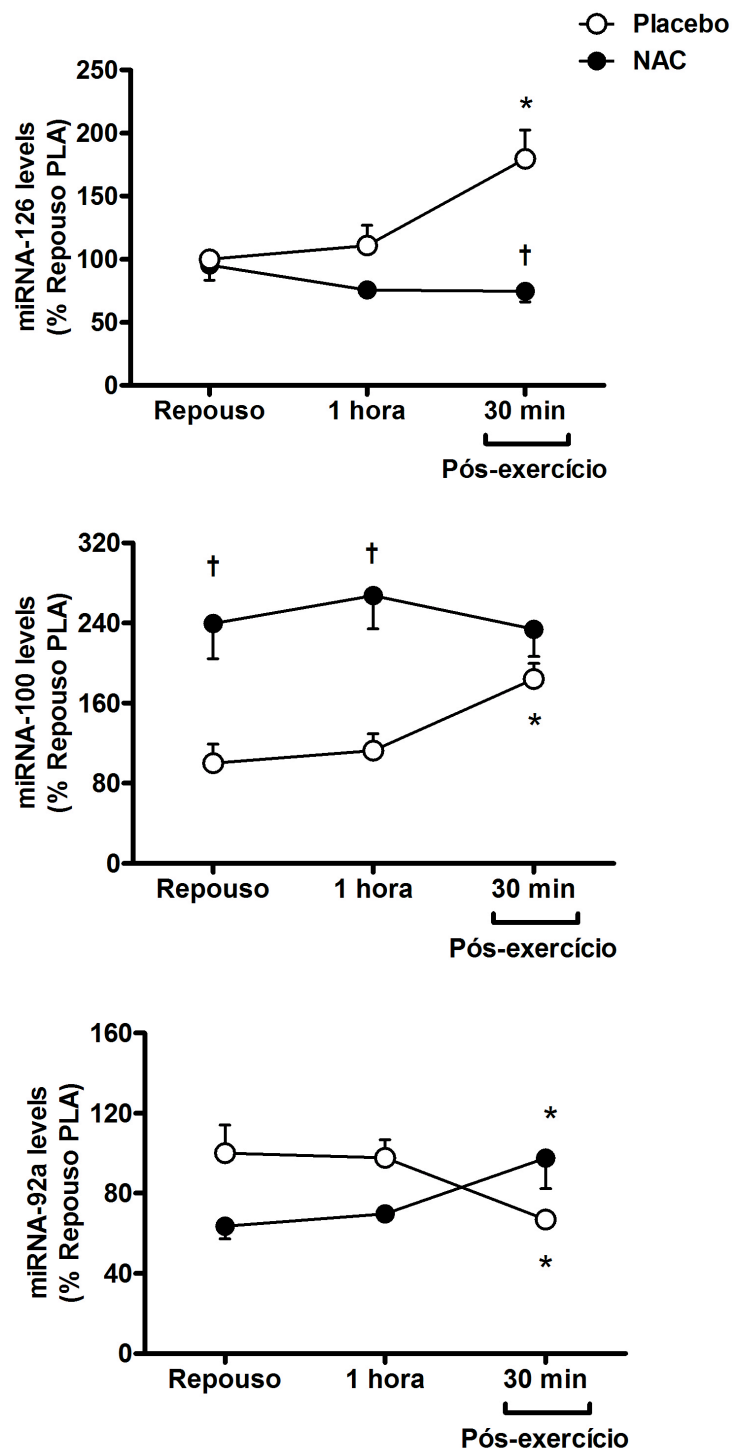


Figura 15 – Expressão dos miRNAs -126, -100 e -92a na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso; † diferença vs Placebo, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

5.11 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante dos alvos do miR-126 relacionados com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

Os resultados apresentados na Figura 16 são referentes ao impacto do tratamento da NAC na expressão gênica circulante dos alvos, PI3KR2 e SPRED-1, do miR-126 em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

A Figura abaixo nos mostra que a PI3KR2 teve sua expressão diminuída após a realização do exercício ($p < 0,05$), entretanto, o tratamento com NAC foi capaz de inibir o efeito do exercício aeróbico máximo. A expressão do SPRED-1 não sofreu nenhuma alteração com a realização do exercício físico e com o tratamento com NAC.

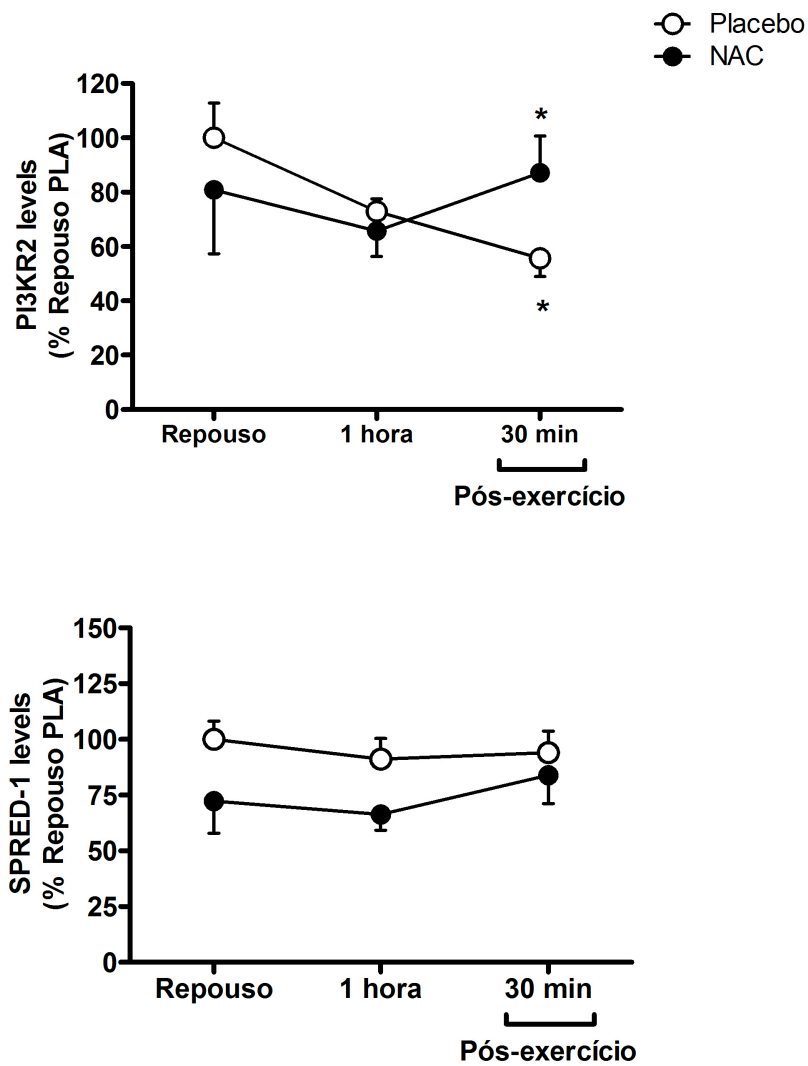


Figura 16 – Expressão dos alvos do miR-126 (PI3KR2 e SPDRE-1) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

5.12 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica sanguínea dos marcadores de angiogênicos em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

Os resultados abaixo (Figura 17) são referentes aos níveis de expressão gênica circulante dos marcadores angiogênicos VEGF, eNOS e HIF-1 α em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício máximo nos pacientes com DAP.

Conforme observado na figura abaixo, os níveis de expressão do VEGF, eNOS e HIF-1 α foram maiores após a realização do exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$). Entretanto, o tratamento com NAC foi capaz de abolir o efeito do exercício aeróbico máximo sobre esses marcadores angiogênicos.

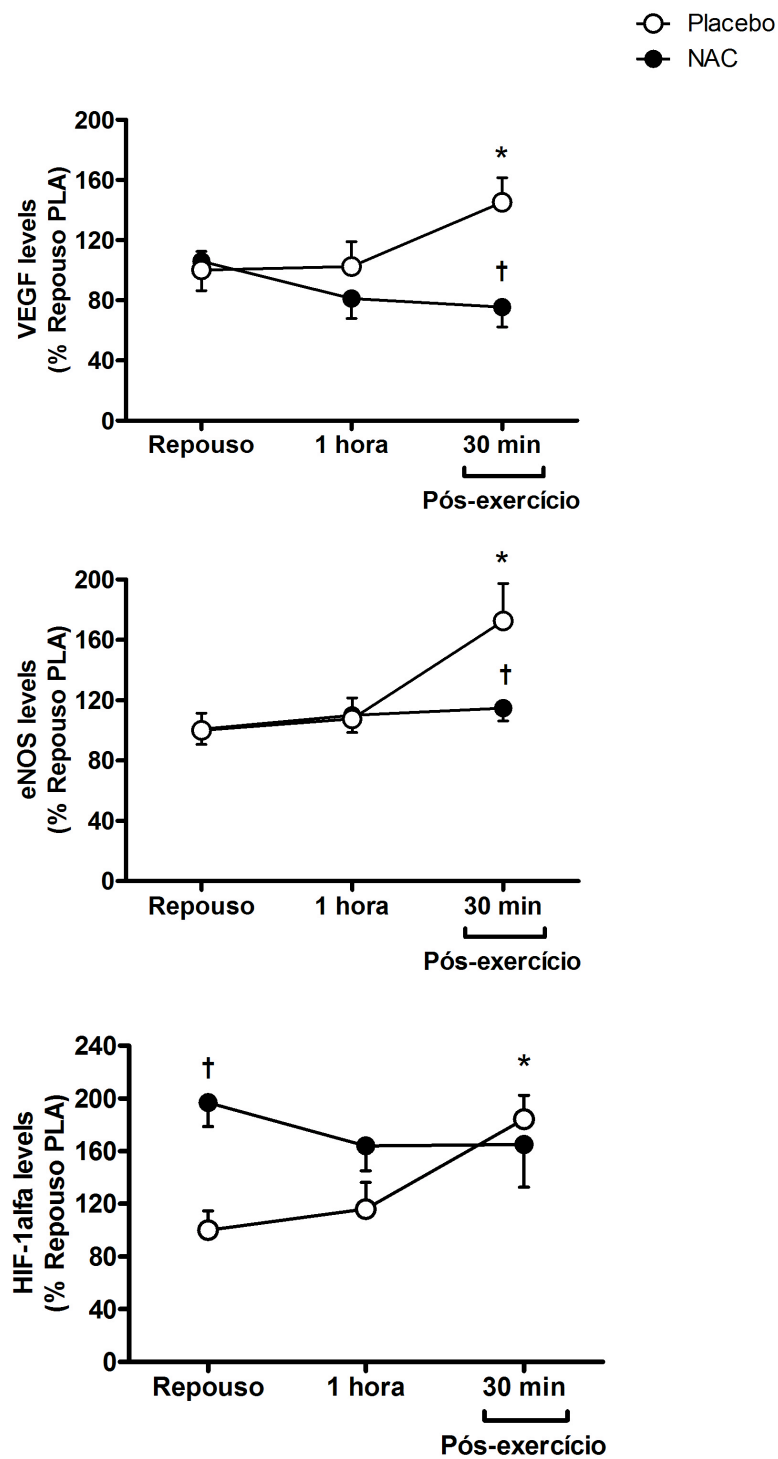


Figura 17 – Expressão gênica de marcadores angiogênicos (VEGF, eNOS e HIF-1 α) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, † diferença vs Placebo, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

5.13 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante do alvo do miR-100 relacionado com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura abaixo (Figura 18) representa o resultado referente ao impacto do tratamento da NAC na expressão gênica circulante da mTOR, alvo do miR-100, em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício nos pacientes com DAP.

Como podemos observar, o exercício aeróbico máximo aumentou a expressão da mTOR. Entretanto, o tratamento com NAC foi capaz de abolir o efeito do exercício aeróbico máximo sobre a mTOR.

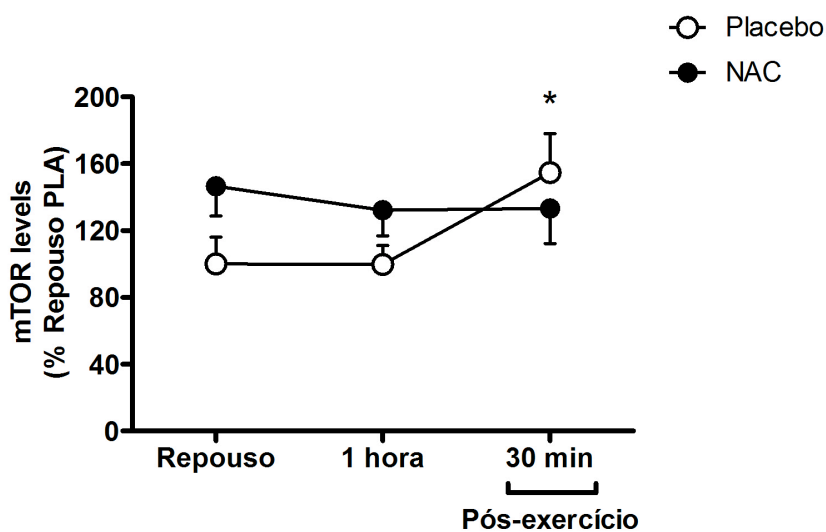


Figura 18 – Expressão do alvo do miR-100 (mTOR) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

5.14 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante do alvo do miR-92a relacionado com angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura 19 representa o resultado referente ao impacto do tratamento da NAC na expressão gênica circulante da ITGA5, alvo do miR-92a, em repouso, 1 hora após ingestão de NAC/Placebo e 30 minutos após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

O resultado abaixo demonstra que a ITGA5 teve sua expressão aumentada após a realização do exercício aeróbico máximo ($p < 0,05$). Em contrapartida, o tratamento com NAC foi capaz de inibir o efeito do exercício aeróbico máximo sobre a ITGA5.

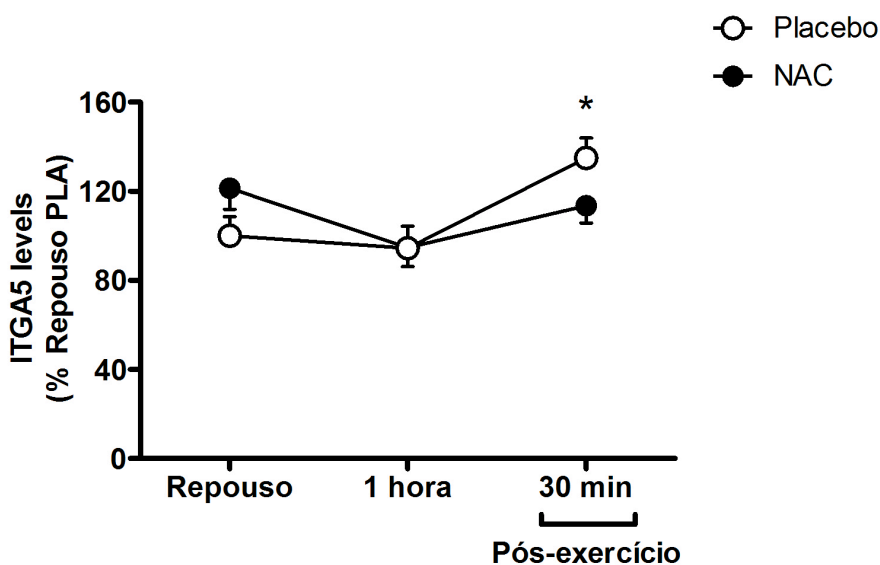


Figura 19 – Expressão do alvo do miR-192a (ITGA5) na corrente sanguínea dos pacientes com DAP entre as sessões experimentais no repouso, 1 hora após a ingestão de NAC ou Placebo e 30 min após a realização do exercício. * diferença vs repouso, $p < 0,05$. Resultado expresso em % do Repouso Placebo.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo demonstram que o exercício aeróbico máximo é capaz de alterar a expressão de c-miRNAs em pacientes com DAP e o tratamento com o antioxidante NAC promove alterações nessas respostas. Além disso, o exercício promoveu alterações em marcadores angiogênicos, inflamatórios e de estresse oxidativo circulantes. Entretanto, o tratamento com NAC preveniu os efeitos do exercício aeróbico máximo nos marcadores angiogênicos e promoveu alteração nos níveis plasmáticos de glutathiona. Adicionalmente, o tratamento com NAC não promoveu alterações no tempo de caminhada, nas respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar, no fluxo sanguíneo basal, na hiperemia reativa pico dos pacientes com DAP.

6.1 Impacto do tratamento com NAC no tempo de caminhada

Como podemos observar a Figura 5, o tratamento com o antioxidante NAC não promoveu alterações no tempo de caminhada até o início da dor e no tempo de caminhada até a exaustão nos pacientes com DAP.

Nossa hipótese era que o tratamento com NAC iria promover através da melhora no estado redox da glutathiona um melhor desempenho físico dos pacientes com DAP. Uma vez que, um estudo que realizou infusão intravenosa de GSH duas vezes ao dia por 5 dias obteve melhora no tempo de caminhada dos pacientes com DAP (Arosio, De Marchi, Zannoni, Prior, & Lechi, 2002). Além disso, Koechlin e colaboradores relataram que o tratamento com NAC, similar ao utilizado no presente estudo, melhorou a resistência do quadríceps em pacientes com DPOC (Koechlin et al., 2004).

As diferenças encontradas nos resultados do presente estudo com o os resultados de Koechlin e colaboradores (Koechlin et al., 2004) podem ser

devidas as diferenças na fisiopatologia da PAD e da DPOC, além das diferenças na modalidade e intensidade dos exercícios utilizados, pois enquanto Koechlin e colaboradores utilizaram um exercício submáximo, com pequena massa muscular (extensão de joelho a 40% da contração voluntária máxima) (Koechlin et al., 2004), os pacientes com PAD do presente estudo foram submetidos a um exercício aeróbico máximo. De fato, outros estudos já demonstraram melhorias no desempenho muscular após o tratamento com NAC durante o exercício com pequena massa muscular em intensidades submáximas (Fowkes et al., 2013; Koechlin et al., 2004). No entanto, optamos por um exercício aeróbico na esteira porque esse chega mais perto do que esses pacientes com DAP passam durante a vida diária com os ciclos de isquemia e reperfusão gerados pela caminhada (Hiatt, Rogers, & Brass, 2014).

6.2 Respostas hemodinâmicas e cardiopulmonar no exercício aeróbico máximo

Como observado na Tabela 2, o tratamento com NAC não promoveu alterações nos valores de VO_2 Pico, FC máxima, PAS e PAD em repouso e pico, e na pressão do tornozelo em repouso e 5 minutos após o exercício máximo nos pacientes com DAP.

Nossa hipótese era que o tratamento com NAC seria capaz de aumentar o desempenho físico desses pacientes fazendo com que eles atingissem valores superiores no VO_2 Pico, FC máxima (FC MAX), maiores valores de Pressão arterial de tornozelo após o exercício aeróbico máximo, devido uma melhora na passagem do fluxo sanguíneo para os membros inferiores desses indivíduos, uma vez que a NAC possui um poder vasodilatador (Kelly, 1998).

Entretanto, como mostrado anteriormente o tratamento com NAC não promoveu alterações em nenhuma dessas variáveis.

Os pacientes com DAP possuem uma menor pressão no tornozelo em relação aos indivíduos saudáveis de mesma idade em repouso, e essa menor pressão reflete em um menor ITB ($ITB < 0,9$) (Aboyans et al., 2012). Todos os nossos pacientes apresentaram um ITB inferior a 0,9, o que os classificam no estágio II da DAP (Hirsch et al., 2006; Norgren et al., 2007). Esse menor ITB é devido esses pacientes apresentarem uma ou mais estenoses ou oclusão arteriais envolvendo a aorta distal, ilíaca, femoral, poplítea ou artérias tibiais (von Ziegler & Costa, 2007). Em repouso, essa limitação, $ITB < 0,9$, não influencia no aporte de oxigênio para a musculatura esquelética, pois o fluxo sanguíneo para a região da panturrilha é adequado (Sorlie & Myhre, 1978). Entretanto, essa limitação faz com que esses pacientes apresentem um desempenho físico prejudicado tanto quando exigidos em um desempenho máximo, quanto nas suas atividades diárias (Gardner, 1993; Gardner et al., 1999). Devido a isso, é observado que o VO_2 Pico desses sujeitos chega a ser em média até 50% inferior quando comparado a indivíduos saudáveis da mesma idade (Gardner et al., 1999).

Hoje sabemos que os pacientes com PAD apresentam um aumento excessivo da pressão arterial e frequência cardíaca durante o exercício (Bakke, Hisdal, Jorgensen, Kroese, & Strandén, 2007), sendo esse aumento de FC e PAS progressivo mesmo quando é realizado uma caminhada de intensidade leve (Bakke et al., 2007; Lorentsen, 1972). Além disso, essas respostas têm sido associadas a gravidade da doença, além de estarem associadas ao aumento da duração da caminhada desses pacientes (Baccelli et al., 1999).

Esse aumento exagerado do reflexo pressor e do sistema nervoso simpático pode vir a contribuir para uma maior vasoconstrição, gerando assim uma redução do fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética dos membros inferiores, o que pode vir a acarretar em um prejuízo do desempenho físico desses pacientes, além de uma sobrecarga cardiovascular exagerada ao longo da execução da caminhada (Bakke et al., 2007; Lorentsen, 1972).

Nesse sentido, esperávamos que o tratamento com NAC fosse capaz de proporcionar um melhor desempenho físico dos pacientes com DAP, devido a NAC como dito anteriormente, além de ser um antioxidante, também ser um vasodilatador e ter um poder anti-inflamatório (Kelly, 1998).

6.3 Impacto do tratamento com NAC no fluxo sanguíneo em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

Conforme demonstrado na Tabela 3, o tratamento com NAC não influenciou no aumento do fluxo sanguíneo basal da perna e na manutenção dos valores da 1ª onda do fluxo sanguíneo da perna após o estímulo da hiperemia reativa fluxo após o exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

Tínhamos como expectativa que o tratamento com NAC aumentasse o fluxo sanguíneo basal da perna desses pacientes após o exercício aeróbico máximo, uma vez que a NAC promove vasodilatação por meio da abertura de canais de potássio na vasculatura (W. Q. Han et al., 2009), além de melhorar a dilatação vascular dependente de endotélio (Andrews et al., 2001; Pieper & Siebeneich, 1998; Zicha et al., 2006), o que esperávamos que diminuísse a disfunção endotelial desses pacientes.

Como comentado no tópico anterior, o fluxo sanguíneo em repouso dos pacientes com DAP, classificados no estágio II da doença, é similar aos indivíduos saudáveis de mesma idade (Aboyans et al., 2012). Entretanto, estudos recentes tem demonstrado que o fluxo sanguíneo para perna desses pacientes após a execução de exercício físico é prejudicado em relação ao repouso (Sorlie & Myhre, 1978), resultado esse que diverge dos encontrados no presente estudo, possivelmente devido a diferença da severidade da doença entre os pacientes dos outros estudos, uma vez que os nossos pacientes possuem uma classificação da doença mais leve.

Outro aspecto interessante é que a dilatação fluxo mediada (FMD) da artéria braquial, região inativa durante o exercício, é reduzida após a realização de exercício aeróbico máximo em pacientes com DAP (Silvestro et al., 2006; Silvestro et al., 2002), e essa redução é devida provavelmente a estenoses fixas nas artérias desses pacientes. No presente estudo não encontramos alterações nos valores da 1ª onda do fluxo sanguíneo da perna após o estímulo da hiperemia reativa quando comparado aos valores anteriores a realização do exercício aeróbico máximo. Entretanto, tínhamos como expectativa que o exercício aeróbico máximo também fosse diminuir os valores da 1ª onda do fluxo sanguíneo da perna após o estímulo da hiperemia reativa (resultados comparados ao FMD).

Esses resultados sugerem que a vasculatura da perna (região ativa durante o exercício) responde de forma diferente ao exercício máximo quando comparado com a artéria braquial em pacientes com DAP. Isso não é surpresa, pois já foi demonstrado que a disfunção vascular da perna é maior do que a braço em pacientes com PAD (Sanada et al., 2005). A manutenção nos valores

da 1ª onda do fluxo sanguíneo da perna após o estímulo da hiperemia reativa após o exercício aeróbico máximo pode ter ocorrido devido a reatividade vascular da perna já está gravemente comprometida, e por isso, é possível que o estímulo do exercício não induza mais disfunção. Outra possibilidade é que, se presente, o prejuízo na função vascular da perna após o exercício seja muito breve.

O tratamento com NAC no presente estudo não melhorou a disfunção endotelial provocada pelo exercício aeróbico máximo nos pacientes com PAD. Em contrapartida, alguns estudos que utilizaram tratamentos com antioxidantes encontraram melhora em partes da disfunção endotelial. Como por exemplo, o estudo de Silvestro e colaboradores que realizou uma infusão intravenosa de vitamina C nos pacientes com DAP e verificaram que esse tratamento preveniu a queda da FMD do braço após a realização de exercício aeróbico máximo (Silvestro et al., 2002). Os estudos que fizeram tratamento com NAC, em outras populações, demonstraram que essa droga melhorou a disfunção endotelial de pacientes com doença renal crônica (Sahin, Yalcin, & Akcar, 2007) e com síndrome cardiorenal (Camuglia, Maeder, Starr, Farrington, & Kaye, 2013). Entretanto, cabe ressaltar que os tratamentos utilizados nesses estudos são consideravelmente mais longos (4 – 6 semanas) quando comparado ao utilizado no presente estudo (4 dias prévio mais o dia do experimento) o que pode corroborar com as diferenças de resultados.

Além disso, disfunção endotelial encontrada nos pacientes com DAP é atrelada geralmente a inflamação e estresse oxidativo que são hoje considerados fatores chave para a progressão da DAP (Brevetti et al., 2010), tópicos esses que serão discutidos a seguir.

6.4 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores inflamatórios em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura 6 demonstra que o exercício aeróbico máximo promoveu aumento nos níveis plasmáticos de MCP-1, ET-1 e VCAM-1. Entretanto, o tratamento com NAC não promoveu nenhuma modificação nos níveis plasmáticos de nenhum desses marcadores inflamatórios em resposta ao exercício.

Tínhamos como hipótese que os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios iriam ser superiores ao final do exercício aeróbico máximo e que o tratamento com NAC iria influenciar nessa resposta, pois achamos que a NAC iria melhorar a disfunção vascular da perna dos pacientes com DAP e isso iria reduzir a isquemia induzida pelo exercício e conseqüentemente a resposta inflamatória.

Atualmente sabemos que os marcadores inflamatórios são mediadores chave para o processo de aterosclerose, e que a aterosclerose contribui diretamente para a manifestação da PAD (Brevetti et al., 2010; Grenon et al., 2013). Esses pacientes com DAP apresentam valores alterados de importantes marcadores inflamatórios, como PCR, IL-6, IL-8, VCAM-1, ICAM-1, TNF- α em repouso quando comparado aos indivíduos saudáveis de mesma idade (Gardner, Parker, Montgomery, & Blevins, 2014; Pande et al., 2015). Além disso, os marcadores inflamatórios são altamente preditores da capacidade de caminhada nesses pacientes (McDermott et al., 2005; McDermott et al., 2003). Como por exemplo, a IL-6, que é inversamente correlacionada com a performance máxima na esteira dos pacientes com PAD (Eltzschig & Collard, 2004); e a PCR que é associada com curtas distancias atingidas no teste de 6

minutos de caminhada (Andreozzi, Leone, Laudani, Deinite, & Martini, 2007) (95 hiatt) e pela piora da performance desses indivíduos nesse teste após um período de 3 anos (M. Chen, Won, Krajewski, & Gottlieb, 2002; Goll, Thompson, Li, Wei, & Cong, 2003).

Sabemos também que a resposta inflamatória gerada pela agressão vascular provocada pelo processo fisiopatológico da aterosclerose afeta a função vascular, reduzindo a biodisponibilidade de NO (Blake & Ridker, 2001; Ridker, 2001).

Além disso, quando os indivíduos com PAD são submetidos ao exercício aeróbico máximo há um aumento dos níveis plasmáticos de diversos marcadores inflamatórios, como TNF- α , VCAM-1, ICAM-1, IL-6, IL-8, ET-1, entre outros (Mangiafico et al., 2000; Signorelli et al., 2003; Tisi, Hulse, Chulakadabba, Gosling, & Shearman, 1997; Tisi & Shearman, 1998; Turton, Coughlin, Kester, & Scott, 2002). Como no estudo de Silvestro (Silvestro et al., 2002) (2002 ALUISIO), que verificou que após o esforço máximo há um aumento das moléculas de adesão associado a uma menor resposta vasodilatadora. O estudo de Brevetti e colaboradores também observaram aumento das moléculas de adesão após a realização do exercício aeróbico máximo (Brevetti et al., 2001). Em outro estudo foi verificado uma maior contagem de neutrófilos ativados no sangue venoso drenado da perna afetada pela DAP após a realização do exercício aeróbico máximo (Neumann et al., 1990). Além disso, o estudo de Kirk e colaboradores observou um aumento significativo de IL-8 após a realização do exercício limitado pela dor da claudicação (Kirk et al., 1999). Corroborando com esses estudos, Nowak e colaboradores relatou aumento do TNF-alfa 6 horas após a realização do

exercício (Nowak et al., 2012). Ainda nesse sentido, Delaney e Spark observaram aumento de IL-6 logo após a realização do exercício aeróbico máximo (Delaney & Spark, 2015). Esse aumento de marcadores inflamatórios ocorrem principalmente pelos ciclos de isquemia / reperfusão gerada pela CI durante a execução do exercício por esses pacientes (Neumann et al., 1990).

Corroborando com todos esses resultados, no presente estudo, encontramos alterações nos valores plasmáticos de MCP-1, VCAM-1 e ET-1 após a realização do exercício aeróbico máximo. Entretanto, como dito anteriormente, o tratamento com NAC não promoveu alterações em nenhum dos marcadores inflamatórios analisados. Esse resultado não corrobora com já foi demonstrado em indivíduos jovens saudáveis, onde o tratamento curto com NAC foi capaz de reduzir a resposta inflamatória ao exercício (Olamaei et al., 2010; Slattery et al., 2014). Essa diferença nos resultados é provavelmente devido ao exercício gerar uma maior isquemia, em relação aos indivíduos jovens, e conseqüentemente um aumento do quadro inflamatório nos pacientes com DAP, dessa forma o tratamento com NAC utilizado não foi capaz de abolir a resposta inflamatória devido a isquemia.

6.5 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de estresse oxidativo plasmático em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

Como observado na Figura 7, o exercício aeróbico máximo promoveu alteração nos níveis plasmáticos apenas do TBARS nos pacientes com DAP. No entanto, a ingestão da NAC no dia do experimento promoveu aumento nos níveis plasmáticos de glutathione e esse aumento se persistiu durante todo o protocolo experimental (5 e 30 min após o exercício máximo). Entretanto, o

tratamento com NAC não promoveu nenhuma modificação nos níveis plasmáticos dos outros marcadores de estresse oxidativo estudado (TBARS e 8-isoprostano).

Tínhamos como hipótese que os níveis plasmáticos dos marcadores de estresse oxidativo iriam ser superiores ao final do exercício aeróbico máximo e que o tratamento com NAC iria influenciar nessa resposta.

Até o momento pouco se sabe sobre as respostas dos marcadores de estresse oxidativo / defesa oxidante ao exercício aeróbico máximo em pacientes com PAD. Um dos primeiros estudos foi o de Silvestro e colaboradores que observaram aumento nos níveis plasmáticos da peroxidação lipídica (TBARS) em resposta ao exercício aeróbico máximo nesses pacientes (Silvestro et al., 2002). Outro estudo que também encontrou essa resposta foi o de Turton e colaboradores que observaram um aumento de TBARS em até 60 minutos após a realização do exercício aeróbico máximo nesses pacientes (Turton et al., 2002). Os resultados do presente estudo corroboram com esses achados uma vez que encontramos aumento nos níveis de TBARS logo após a execução do exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP.

Em relação a defesa antioxidante, Turton e colaboradores demonstraram uma maior capacidade antioxidante total dos pacientes com PAD após a realização de exercício aeróbico máximo, valores similares ao grupo controle saudável utilizado (Turton et al., 2002). No entanto, como discutido no parágrafo anterior, o aumento da resposta oxidante foi maior do que da defesa antioxidante o que resultou em elevação do estresse oxidativo.

Outro estudo verificou um aumento da enzima SOD seis horas após a realização do exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP (Nowak et al., 2012). No presente estudo, avaliamos os níveis plasmáticos da glutathiona, um ótimo marcador do balanço redox (GSH/GSSG), pois a glutathiona é o principal composto antioxidante intracelular por atuar nas enzimas GSH-Px (papel protetor contra o estresse oxidativo), e verificamos que o balanço redox não se alterou após a realização do exercício aeróbico máximo nos pacientes com DAP, ou seja, o exercício não foi um estímulo capaz de aumentar a defesa antioxidante frente a ação oxidante, o que ocasionou um aumento do estresse oxidativo observado pelo aumento do TBARS.

Na tentativa de diminuir o estresse oxidativo em indivíduos com PAD, alguns estudos têm utilizado tratamentos com antioxidantes (Andrews et al., 2001; Koechlin et al., 2004; Silvestro et al., 2002). Assim, utilizamos no presente estudo um tratamento com NAC.

Como abordado na revisão de literatura, a NAC é um potente antioxidante não específico que possui um grupamento SH que estimula a síntese de GSH, diminuindo assim o estresse oxidativo (Kelly, 1998). De fato, a ingestão de NAC no dia do experimento (momento 1 hora após ingestão) proporcionou um aumento do balanço redox (GSH/GSSG) que persistiu até o final da sessão experimental. Resultado esse que corrobora com outros estudos da literatura, como o estudo de Ferreira, Campbell e Reid que verificou que o tratamento oral de NAC aumentou os níveis plasmáticos de glutathiona em indivíduos jovens (Ferreira et al., 2011). Andrews e colaboradores demonstraram em coronariopatas que o tratamento intra-arterial de NAC produz efeitos benéficos (Andrews et al., 2001). Além disso, um estudo que

utilizou tratamento com NAC similar ao utilizado no presente estudo observou uma diminuição do estresse oxidativo em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) após a realização de exercício aeróbico máximo (Koechlin et al., 2004).

6.6 Impacto do tratamento com NAC nos marcadores de angiogênese em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

Como sabemos, a inflamação e estresse oxidativo são fatores chave para o desenvolvimento e progressão da PAD (Brevetti et al., 2010) e esses fatores estão associados com rarefação vascular (Goligorsky, 2010), o que pode prejudicar o potencial angiogênico do exercício (Basic, Jacobsen, Sirsjo, & Abdel-Halim, 2014; Ungvari et al., 2013). Como os indivíduos com PAD possuem uma disfunção endotelial acarretada por um aumento desses fatores (Munzel et al., 2010), tínhamos como hipótese que o exercício aeróbico máximo iria estimular o aumento dos marcadores angiogênicos circulantes (devido aos aumentos dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo), e que com o tratamento de NAC haveria uma diminuição da inflamação e estresse oxidativo o que facilitaria ainda mais o estímulo do exercício aeróbico máximo em aumentar os marcadores angiogênicos.

Como sabemos, alguns mecanismos podem desencadear uma resposta angiogênica, tais como hipóxia, aumento do fluxo sanguíneo, óxido nítrico, ativação de integrinas, e o VEGF, entre outros fatores de crescimento (Conway, Collen, & Carmeliet, 2001; Kumar, 1998; Maisonpierre et al., 1997; Prior, Yang, & Terjung, 2004).

O VEGF é considerado o mais potente fator angiogênico conhecido (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Este possui 3 receptores específicos de ligação (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), mas cada receptor quando ativado produz diferentes efeitos (Gustafsson et al., 2007), sendo que a ligação entre o VEGF e o VEGFR2 produz uma resposta angiogênica por algumas vias de sinalização (Conway et al., 2001), como a via da PI3K/AKT/eNOS (Daher, Boulay, Desjardins, Gratton, & Claing, 2010), e a via da MAP quinase RAS/Raf-1/MEK/ERK1/2 (Marshall, 1995).

Entretanto, os indivíduos com DAP possuem uma menor expressão gênica de VEGF na musculatura isquêmica da perna (Palmer-Kazen et al., 2004), mas a caminhada é capaz de promover um aumento de VEGF nessa musculatura, provavelmente devido o exercício promover uma hipóxia na musculatura local que acarreta em aumento do HIF-1 α (estímulo para síntese de VEGF) (Palmer-Kazen et al., 2009).

Até o momento poucos estudos avaliaram os níveis plasmáticos de marcadores angiogênicos dos indivíduos com PAD após a realização de um exercício aeróbico máximo (Nowak et al., 2012; Palmer-Kazen et al., 2009; Sandri et al., 2011; Wood et al., 2006). Nesse sentido, ainda há uma controvérsia nos resultados encontrados, pois em 3 estudos foi observado que o exercício aeróbico máximo não foi um estímulo angiogênico (não alterou os níveis de VEGF) (Nowak et al., 2012; Palmer-Kazen et al., 2009; Wood et al., 2006), enquanto que o estudo de Sandri e colaboradores demonstrou que o exercício é sim um estímulo para alterar os níveis de VEGF plasmáticos (Sandri et al., 2011). No presente estudo, avaliamos expressão gênica circulante do VEGF, além de ser o primeiro estudo que conhecemos que avaliou a

expressão gênica da eNOS, mTOR, HIF-1 α e ITGA5 na corrente sanguínea de indivíduos com PAD.

Como dito anteriormente, a condição de hipóxia é um fator que estimula a produção de RNAm de VEGF através da ativação de mTOR que estimula o HIF-1 α (Humar et al., 2002; Prior, Yang, et al., 2004; Zhong et al., 2000). No presente estudo encontramos uma maior produção de RNAm de VEGF, mTOR e de HIF-1 α após a execução do exercício. Além disso, a eNOS, enzima ativada através da sinalização de VEGF (Lin & Sessa, 2006), também teve sua produção de RNAm aumentada. Encontramos ainda uma maior produção de RNAm de ITGA5 após a execução do exercício, essa subunidade da integrina é capaz de ativar a quinase de adesão focal (FAK), desencadeando assim uma ativação da via sinalização angiogênica Raf-MEK-ERKs (Kumar, 1998), além de estimular a PI3K.

Dessa forma, o exercício aeróbico máximo em indivíduos com DAP pode estimular a angiogênese de três formas, 1) o aumento de VEGF faz com que esse se ligue no seu receptor 2 (VEGFR2) desencadeando a ativação da via de sinalização PI3K/AKT/eNOS, 2) pela ativação de VEGF via hipóxia e 3) pelo aumento de integrina que pode desencadear a ativação da via de sinalização FAK/Raf-1/MEK/ERKs. (FIGURA 20).

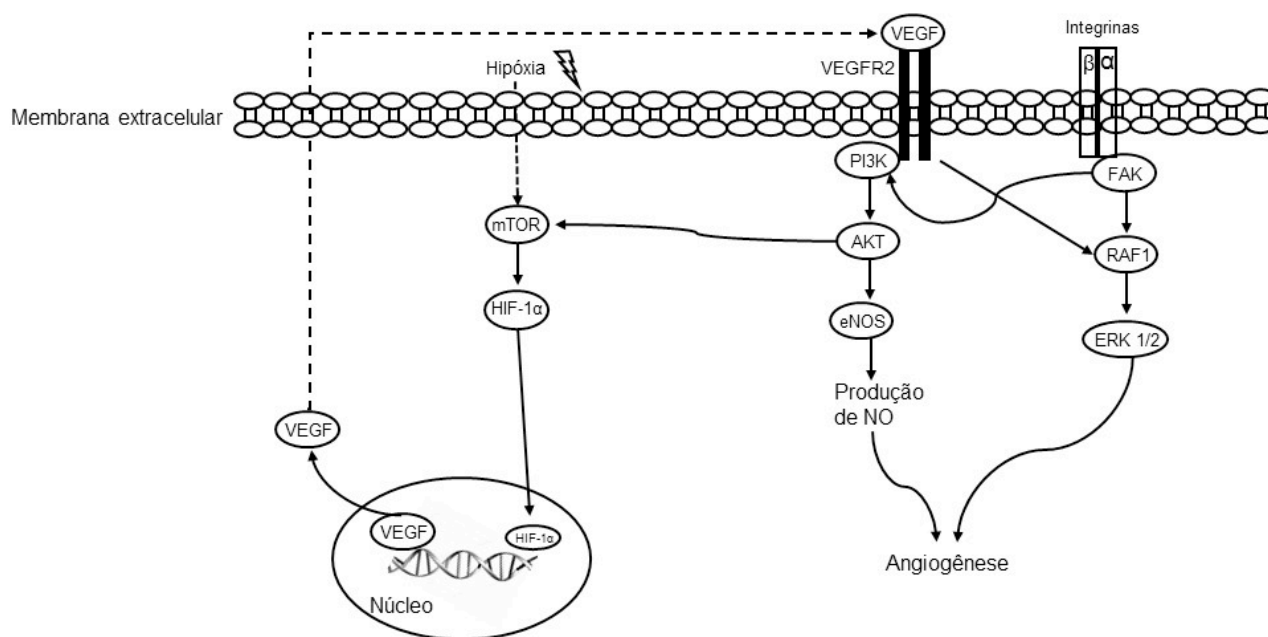


Figura 20 – Representação esquemática das vias de sinalizações angiogênicas ativadas pelo exercício aeróbico máximo na circulação de pacientes com DAP.

Como destacado no início do tópico, o aumento do estresse oxidativo tem sido ligado a uma prejudicada sinalização angiogênica e a rarefação vascular em músculo esquelético (Basic et al., 2014; Goligorsky, 2010). Nesse sentido, alguns estudos têm testado a suplementação com antioxidantes em populações que possuem aumento desses marcadores obtendo benefícios para essas populações, como por exemplo, melhora da fadiga muscular em indivíduos com DPOC (Koechlin et al., 2004). Entretanto, nenhum estudo verificou a resposta da sinalização angiogênica ao exercício em indivíduos com DAP tratados com NAC.

Contrariando a nossa hipótese inicial, o tratamento com NAC aboliu toda resposta angiogênica ao exercício aeróbico máximo, sugerindo assim que a resposta angiogênica é sensível a modulação redox. Estes resultados corroboram com o conceito cada vez mais reconhecido que várias vias de

sinalizações envolvidas nas adaptações ao exercício são dependentes do estresse oxidativo (Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow et al., 2009). Como por exemplo, antioxidantes têm prevenido o aumento do peroxissoma ativado pelo proliferador do receptor coativador gama 1-alfa (PGC-1 α), um regulador importante da angiogênese no músculo esquelético (Ristow et al., 2009; Silveira, Pilegaard, Kusuhara, Curi, & Hellsten, 2006). Além disso, outro estudo mostrou que a infusão de uma alta dose de NAC atenua algumas respostas adaptativas ao exercício nos músculos esqueléticos em indivíduos jovens saudáveis (Petersen et al., 2012).

Juntamente com nossas descobertas, estas observações indicam que o tratamento curto com NAC pode potencialmente ter efeitos prejudiciais na resposta angiogênica, em vez de benefícios para indivíduos com PAD.

6.7 Impacto do tratamento com NAC na expressão gênica circulante de microRNAs em repouso e em resposta a sessão aguda de exercício aeróbico máximo

A Figura 15 nos mostra que o exercício aeróbico máximo alterou a expressão dos miRs- 126, -100 e 92a na corrente sanguínea de pacientes com DAP. Entretanto, o tratamento com NAC aboliu toda o efeito do exercício nesses indivíduos. Tínhamos como hipótese que o exercício aeróbico máximo iria promover alterações na expressão dos miRNAs envolvidos na regulação da angiogênese (miRs- 126, 100 e 92a) e o tratamento com NAC iria promover um aumento ainda maior nesses miRNAs por bloquear o estresse oxidativo e inflamação.

Em relação aos miRNAs que foram selecionados a partir do *microarray de microRNAs*, não encontramos diferenças no miR-199b-3p e o miR-620 não

foi amplificado no sangue pela técnica de PCR em tempo real. Como podemos observar na Figura 13, os dois miRNAs selecionados possuem uma expressão gênica baixa na circulação dos pacientes com DAP, fato esse que pode ter influenciado na não confirmação na alteração de expressão do miR-199b-3p com o exercício e na não amplificação do miR-620 pela técnica de PCR em tempo real. Apesar do miR-199b-3p não ter sua expressão alterada após o exercício aeróbico máximo, um possível alvo desse miRNA a partir da predição *in silico*, a mTOR, teve sua expressão aumentada, o que favorece o estímulo angiogênico, como discutido no tópico acima.

Como observamos, os miRNAs relacionados com angiogênese tiveram suas expressões alteradas com o exercício aeróbico máximo, mostrando assim o papel regulatório desses miRNAs nas alterações observadas nos marcadores angiogênicos.

O miR-126 é considerado o principal miRNA envolvido na angiogênese devido esse ser o miRNA com maior expressão em células endoteliais (Fish et al., 2008; S. Wang et al., 2008). Um recente estudo demonstrou que o miR-126 está marcadamente reduzido na circulação de pacientes com DAP (Stather et al., 2013). No entanto, no presente estudo foi o primeiro a mostrar que o exercício aeróbico máximo é capaz de aumentar a expressão circulante desse miRNA nesses pacientes corroborando assim com o aumento da sinalização angiogênica na circulação desses pacientes. Nosso resultado corrobora com dados da literatura que mostram aumento da expressão circulante do miR-126 após a realização de exercício aeróbico em indivíduos saudáveis (Baggish et al., 2014; Uhlemann et al., 2014).

O miR-126 possui como alvos validados a PI3KR2, Spred-1 e VCAM-1 (Fish et al., 2008; T. A. Harris et al., 2008; S. Wang et al., 2008). O alvo VCAM-1 está relacionado com inflamação, e como observado nos nossos resultados, o exercício aeróbico máximo aumentou os níveis plasmáticos da VCAM-1, o que nos sugere que o miR-126 não foi capaz de ter uma ação efetiva sobre esse alvo, possivelmente devido esses pacientes possuírem um elevado nível plasmático dessa molécula somado ao exercício que é um estímulo extra capaz de aumentar ainda mais esses níveis como discutido em um tópico anterior.

Os alvos PI3KR2 e Spred-1 são alvos relacionados com angiogênese. Observamos na Figura 16, que a expressão da PI3KR2 está diminuída após a execução do exercício aeróbico máximo, o que nos sugere uma ação do miR-126 sobre esse alvo. Esse alvo (PI3KR2), atua regulando negativamente a atividade da proteína PI3K (Ueki et al., 2003), uma proteína da via de sinalização da VEGF/PI3K/Akt/eNOS, facilitando dessa forma a sinalização angiogênica. Em um estudo anterior do nosso laboratório mostramos a participação do miR-126 na angiogênese cardíaca proveniente do treinamento aeróbico por uma ação efetiva desse miRNA sobre a PI3KR2 (Da Silva et al., 2012).

O miR-92a está relacionado a angiogênese estimulada por processos isquêmicos. O miR-92a possui sua expressão aumentada em modelo experimental com isquemia de membros posteriores. Além disso, os autores observaram que o miR-92a possui sua expressão aumentada em células endoteliais humanas após estimulação isquêmica, e que esse miRNA possui como alvo relacionado com a angiogênese, a ITGA5 (Bonauer et al., 2009). No

presente estudo, fomos o primeiro a observar uma diminuição da expressão desse miRNA e um aumento da expressão da ITGA5, alvo desse miRNA, na circulação dos pacientes com DAP após a realização do exercício aeróbico máximo, o que nos sugere uma ação efetiva desse miRNA sobre esse alvo, facilitando assim uma sinalização angiogênica (FAK/Raf-1/MEK/ERKs). No entanto, até o momento não encontramos nenhum estudo na literatura que avaliou o efeito do exercício na expressão desse miRNA na circulação em outras populações, possivelmente devido esse miRNA está relacionado a angiogênese em situações isquêmicas.

O outro miRNA avaliado no presente estudo, o miR-100, também está associado a angiogênese em situações isquêmicas de membros inferiores de modelo animal, nessas situações esse miRNA possui sua expressão diminuída (Grundmann et al., 2011). Além disso, este estudo mostrou que o miR-100 é altamente expresso em células endoteliais umbilicais e em células musculares lisa de aorta humana, mostrando assim que esse miRNA tem sua expressão aumentada apenas em situações isquêmicas. O miR-100 possui como alvo relacionado com a angiogênese a mTOR, como discutido no tópico anterior, a mTOR estimula angiogênese em situações de hipóxia através da estimulação do HIF-1 α (Humar et al., 2002; W. Li et al., 2007; Prior, Lloyd, et al., 2004; Prior, Yang, et al., 2004). No presente estudo, observamos um aumento desse miRNA, além de um aumento da mTOR na circulação após a realização do exercício aeróbico máximo pelos pacientes com DAP, o que nos sugere que esse miRNA não inibiu totalmente esse alvo.

Apenas um estudo na literatura até o momento avaliou a resposta da expressão do miR-100 após treinamento físico aeróbico, Ramasany e

colaboradores (2015) observaram que a hipertrofia cardíaca gerada pelo treinamento de natação em ratos *Winstar* foi regulada pelo miR-100, que por sua vez está diminuída nessa situação, enquanto que a expressão da mTOR se encontrou aumentada, sugerindo assim uma inibição efetiva desse miRNA sobre seu alvo (Ramasamy, Velmurugan, Shanmugha Rajan, Ramprasath, & Kalpana, 2015). Entretanto, diferente do presente estudo, o treinamento de natação em ratos *Winstar* não proporciona uma isquemia/hipóxia como a observada nos pacientes com DAP, o que pode corroborar pela adversidade dos resultados, uma vez que esse miRNA tem sua expressão aumentada apenas em situações isquêmicas.

Uma possível explicação para este fato é que outros miRNAs, como o miR-99a (Q. Li et al., 2016), ou até mesmo outros mecanismos de regulação gênica podem estar influenciando nesse aumento da expressão da mTOR estimulado pelo exercício aeróbico máximo nesses pacientes. Além disso, sabemos que o exercício aeróbico máximo proporciona nesses pacientes uma grande isquemia/hipóxia o que pode fazer com quem a mTOR tenha um grande aumento da sua expressão, aumento esse que pode ser maior do que a “capacidade” de inibição do miR-100. Outro fato que corrobora com o resultado do aumento da mTOR encontrado após o exercício, é que também encontramos um aumento de HIF-1 α na circulação dos pacientes com DAP, molécula estimulada pela mTOR em situações de hipóxia.

Com os resultados referentes ao miRNAs, temos que o exercício aeróbico máximo foi capaz de estimular a expressão de marcadores angiogênicos e que alguns miRNAs que possuem alvos envolvidos com angiogênese regulam esse processo (Figura 21).

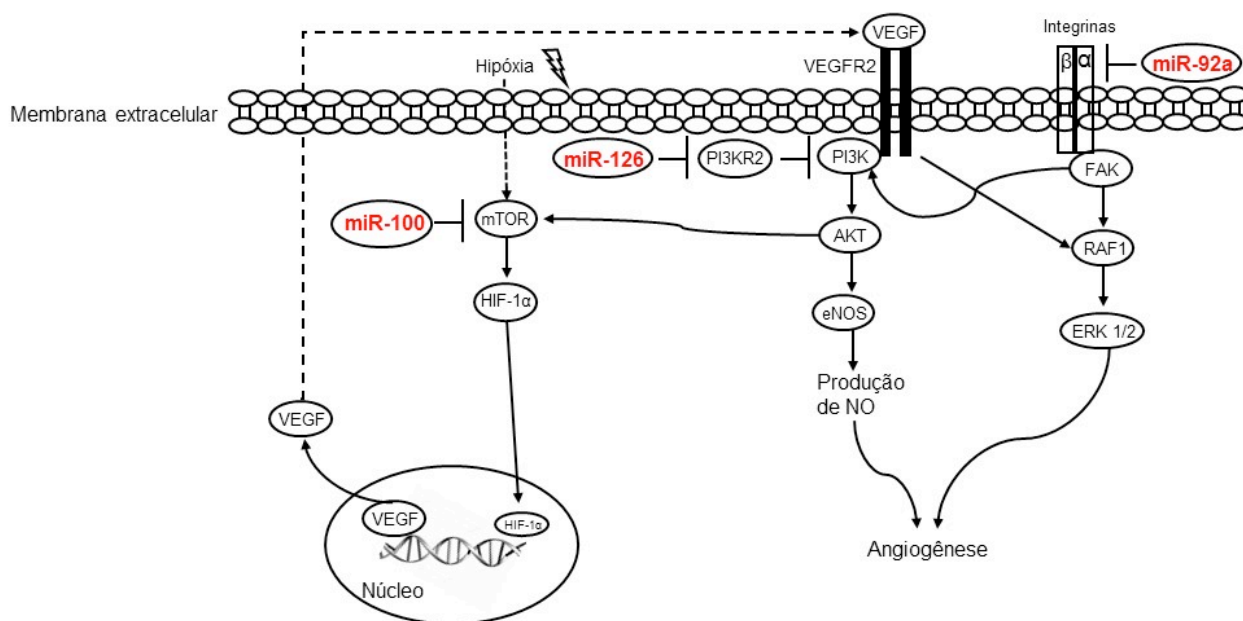


Figura 21 – Representação esquemática das vias de sinalizações angiogênicas e da regulação dos miRNAs relacionados com angiogênese após o exercício aeróbico máximo na circulação de pacientes com DAP.

Por outro lado, o tratamento com NAC, ao contrário da nossa hipótese inicial, aboliu toda a regulação angiogênica circulante promovida pelos miRNAs em resposta ao estímulo do exercício aeróbico máximo, sugerindo que a modulação dos miRNAs envolvidos na angiogênese na circulação, assim como os marcadores angiogênicos, são sensíveis ao estado redox.

6.8 Implicações clínicas

Estudos prévios, tanto no nosso laboratório (Wolosker, Nakano, Rosoky, & Puech-Leao, 2003), quanto outros (Lane, Ellis, Watson, & Leng, 2014) tem mostrado que o treinamento físico promove um importante aumento da capacidade funcional dos pacientes com DAP. Esse efeito é provavelmente mediado pelo aumento da capilarização muscular, o que aumenta a área de

superfície para entrega de oxigênio e troca de nutrientes (Duscha et al., 2011). Apesar desta adaptação benéfica, alguns estudos indicam que o repetitivo exercício isquêmico pode levar a danos aos músculos esqueléticos, como pelo aumento da fibrose tecidual (Hiatt et al., 1996) e ativação de cascatas de sinalização proteolíticas (Delaney, Miller, Chataway, & Spark, 2014) provenientes do treinamento aeróbico em pacientes com DAP.

Essas anormalidades têm sido largamente atribuídas ao dano oxidativo que ocorre durante as sessões de exercício isquêmicos (Pipinos, Judge, et al., 2008; Pipinos et al., 2006). A partir desse conceito, minimizar o estresse oxidativo induzido pelo exercício através de um tratamento antioxidante iria, em teoria, aumentar os benefícios do treinamento aeróbico em pacientes com DAP. Por outro lado, os resultados do presente estudo sugerem que o estresse oxidativo é um requisito para a resposta angiogênica sistêmica ao exercício nesses pacientes, e inibir esse sinal pode vir a prejudicar a angiogênese do músculo esquelético.

Um número crescente de estudos tem documentado o fato de que o tratamento antioxidante dificulta as adaptações induzidas pelo exercício, incluindo a angiogênese (Gliemann et al., 2014) e biogênese mitocondrial (Gomez-Cabrera et al., 2008; Paulsen et al., 2014; Ristow et al., 2009). Portanto, o tratamento com antioxidantes durante o exercício aeróbico pode trazer benefícios (redução do estresse oxidativo), bem como consequências prejudiciais (redução da angiogênese) em pacientes com DAP. Nesse sentido, em termos de desempenho de caminhada, a combinação de terapia de antioxidante e exercício aeróbico em pacientes com DAP precisa ser mais estudada.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo revela um novo mecanismo molecular do exercício aeróbico máximo sobre a expressão gênica de marcadores angiogênicos circulantes em pacientes com DAP. Esse mecanismo é a participação dos c-miRNAs nesse processo, uma vez que o exercício aeróbico máximo proporcionou alteração de alguns c-miRNAs acompanhado de alterações de seus alvos relacionados com angiogênese, além de alterações de marcadores angiogênicos.

O presente estudo revela também que o tratamento com NAC melhora o balanço redox dos pacientes com DAP. Apesar disso, a NAC não influenciou na capacidade de caminhada desses pacientes. Mais importante, o tratamento com NAC aboliu a resposta angiogênica sistêmica mediada por c-miRNAs ao exercício aeróbico máximo, sugerindo assim que o estresse oxidativo sistêmico induzido pelo exercício é crucial na resposta angiogênica sistêmica ao exercício em pacientes com DAP.

8. REFERENCIAS

- Aboyans, V., Criqui, M. H., Abraham, P., Allison, M. A., Creager, M. A., Diehm, C., . . . Anesthesia. (2012). Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *126*(24), 2890-2909. doi: 10.1161/CIR.0b013e318276fbc
- Ai, J., Zhang, R., Li, Y., Pu, J., Lu, Y., Jiao, J., . . . Yang, B. (2010). Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, *391*(1), 73-77. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.005
- Al-Qaisi, M., Nott, D. M., King, D. H., & Kaddoura, S. (2009). Ankle brachial pressure index (ABPI): An update for practitioners. *Vasc Health Risk Manag*, *5*, 833-841.
- American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. (1998). *Med Sci Sports Exerc*, *30*(6), 992-1008.
- Andreozzi, G. M., Leone, A., Laudani, R., Deinite, G., & Martini, R. (2007). Acute impairment of the endothelial function by maximal treadmill exercise in patients with intermittent claudication, and its improvement after supervised physical training. *Int Angiol*, *26*(1), 12-17.
- Andrews, N. P., Prasad, A., & Quyyumi, A. A. (2001). N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol*, *37*(1), 117-123.
- Aoi, W., Naito, Y., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Ichikawa, H., & Yoshikawa, T. (2010). The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *298*(4), E799-806. doi: 10.1152/ajpendo.00448.2009
- Arosio, E., De Marchi, S., Zannoni, M., Prior, M., & Lechi, A. (2002). Effect of glutathione infusion on leg arterial circulation, cutaneous microcirculation, and pain-free walking distance in patients with peripheral obstructive arterial disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc*, *77*(8), 754-759.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., . . . Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(12), 5003-5008. doi: 10.1073/pnas.1019055108
- Baccelli, G., Reggiani, P., Mattioli, A., Corbellini, E., Garducci, S., & Catalano, M. (1999). The exercise pressor reflex and changes in radial arterial pressure and heart rate during walking in patients with arteriosclerosis obliterans. *Angiology*, *50*(5), 361-374.
- Baggish, A. L., Hale, A., Weiner, R. B., Lewis, G. D., Systrom, D., Wang, F., . . . Chan, S. Y. (2011). Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*, *589*(Pt 16), 3983-3994. doi: 10.1113/jphysiol.2011.213363
- Baggish, A. L., Park, J., Min, P. K., Isaacs, S., Parker, B. A., Thompson, P. D., . . . Chan, S. Y. (2014). Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol (1985)*, *116*(5), 522-531. doi: 10.1152/jappphysiol.01141.2013
- Bakke, E. F., Hisdal, J., Jorgensen, J. J., Kroese, A., & Strandén, E. (2007). Blood pressure in patients with intermittent claudication increases continuously during walking. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *33*(1), 20-25. doi: 10.1016/j.ejvs.2006.06.023
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.
- Basic, V. T., Jacobsen, A., Sirsjo, A., & Abdel-Halim, S. M. (2014). TNF stimulation induces VHL overexpression and impairs angiogenic potential in skeletal muscle myocytes. *Int J Mol Med*, *34*(1), 228-236. doi: 10.3892/ijmm.2014.1776
- Becker, G. J., McClenny, T. E., Kovacs, M. E., Raabe, R. D., & Katzen, B. T. (2002). The importance of increasing public and physician awareness of peripheral arterial disease. *J Vasc Interv Radiol*, *13*(1), 7-11.
- Belch, J. J., Mackay, I. R., Hill, A., Jennings, P., & McCollum, P. (1995). Oxidative stress is present in atherosclerotic peripheral arterial disease and further increased by diabetes mellitus. *Int Angiol*, *14*(4), 385-388.
- Belch, J. J. F., McLaren, M., Khan, F., Hickman, P., Muir, A., & Stonebridge, P. (2002). The inflammatory process in intermittent claudication. *Eur Heart J Supplements*, *4*(Suppl B), B31-B34.

- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., & Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, *120*(1), 21-24. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.031
- Bhat, H. K., Hiatt, W. R., Hoppel, C. L., & Brass, E. P. (1999). Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation*, *99*(6), 807-812.
- Blake, G. J., & Ridker, P. M. (2001). Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res*, *89*(9), 763-771.
- Blann, A. D., Dobrotova, M., Kubisz, P., & McCollum, C. N. (1995). von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, *74*(2), 626-630.
- Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K., & Frolich, J. C. (1997). Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, *95*(8), 2068-2074.
- Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., . . . Dimmeler, S. (2009). MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*, *324*(5935), 1710-1713. doi: 10.1126/science.1174381
- Borg, G. (1990). Psychophysical scaling with applications in physical work and the perception of exertion. *Scand J Work Environ Health*, *16 Suppl 1*, 55-58.
- Borgstrom, L., & Kagedal, B. (1990). Dose dependent pharmacokinetics of N-acetylcysteine after oral dosing to man. *Biopharm Drug Dispos*, *11*(2), 131-136.
- Borgstrom, L., Kagedal, B., & Paulsen, O. (1986). Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol*, *31*(2), 217-222.
- Brass, E. P., & Hiatt, W. R. (2000). Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease. *Vasc Med*, *5*(1), 55-59.
- Brass, E. P., Hiatt, W. R., Gardner, A. W., & Hoppel, C. L. (2001). Decreased NADH dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in peripheral arterial disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *280*(2), H603-609.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, *3*(3), e85. doi: 10.1371/journal.pbio.0030085
- Brevetti, G., De Caterina, M., Martone, V. D., Ungaro, B., Corrado, F., Silvestro, A., . . . Scopacasa, F. (2001). Exercise increases soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in patients with intermittent claudication. *Clin Hemorheol Microcirc*, *24*(3), 193-199.
- Brevetti, G., Giugliano, G., Brevetti, L., & Hiatt, W. R. (2010). Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*, *122*(18), 1862-1875. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.918417
- Brevetti, G., Schiano, V., & Chiariello, M. (2008). Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis*, *197*(1), 1-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.002
- Camuglia, A. C., Maeder, M. T., Starr, J., Farrington, C., & Kaye, D. M. (2013). Impact of N-acetylcysteine on endothelial function, B-type natriuretic peptide and renal function in patients with the cardiorenal syndrome: a pilot cross over randomised controlled trial. *Heart Lung Circ*, *22*(4), 256-259. doi: 10.1016/j.hlc.2012.10.012
- Caporali, A., Meloni, M., Vollenkle, C., Bonci, D., Sala-Newby, G. B., Addis, R., . . . Emanuelli, C. (2011). Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation*, *123*(3), 282-291. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.952325
- Chaudhuri, K., & Chatterjee, R. (2007). MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. *DNA Cell Biol*, *26*(5), 321-337. doi: 10.1089/dna.2006.0549
- Chen, C. Z., & Lodish, H. F. (2005). MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*, *17*(2), 155-165. doi: 10.1016/j.smim.2005.01.001
- Chen, M., Won, D. J., Krajewski, S., & Gottlieb, R. A. (2002). Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem*, *277*(32), 29181-29186. doi: 10.1074/jbc.M204951200
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., . . . Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, *18*(10), 997-1006. doi: 10.1038/cr.2008.282

- Chen, Y., & Gorski, D. H. (2008). Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*, *111*(3), 1217-1226. doi: 10.1182/blood-2007-07-104133
- Cheng, Y., Tan, N., Yang, J., Liu, X., Cao, X., He, P., . . . Zhang, C. (2010). A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*, *119*(2), 87-95. doi: 10.1042/CS20090645
- Comerota, A. J., Throm, R. C., Kelly, P., & Jaff, M. (2003). Tissue (muscle) oxygen saturation (StO₂): a new measure of symptomatic lower-extremity arterial disease. *J Vasc Surg*, *38*(4), 724-729.
- Conway, E. M., Collen, D., & Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, *49*(3), 507-521.
- Corsten, M. F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., . . . Schroen, B. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, *3*(6), 499-506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415
- Criqui, M. H., Langer, R. D., Fronek, A., Feigelson, H. S., Klauber, M. R., McCann, T. J., & Browner, D. (1992). Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med*, *326*(6), 381-386. doi: 10.1056/NEJM199202063260605
- Da Silva, N. D., Jr., Fernandes, T., Soci, U. P. R., Monteiro, A. W. A., Phillips, M. I., & de Oliveira, E. M. (2012). Swimming Training in Rats Increases Cardiac MicroRNA-126 Expression and Angiogenesis. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *44*(8), 1453-1462. doi: 10.1249/MSS.0b013e31824e8a36
- Daher, Z., Boulay, P. L., Desjardins, F., Gratton, J. P., & Claing, A. (2010). 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*, *285*(32), 24591-24599. doi: 10.1074/jbc.M110.115311
- Davidson, P. K., Gallagher, I. J., Hartman, J. W., Tarnopolsky, M. A., Dela, F., Helge, J. W., . . . Phillips, S. M. (2011). High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *J Appl Physiol (1985)*, *110*(2), 309-317. doi: 10.1152/jappphysiol.00901.2010
- Delaney, C. L., Miller, M. D., Chataway, T. K., & Spark, J. I. (2014). A randomised controlled trial of supervised exercise regimens and their impact on walking performance, skeletal muscle mass and calpain activity in patients with intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *47*(3), 304-310. doi: 10.1016/j.ejvs.2013.12.021
- Delaney, C. L., & Spark, J. I. (2015). A randomised controlled trial of two supervised exercise regimens and their impact on inflammatory burden in patients with intermittent claudication. *Vascular*. doi: 10.1177/1708538115617622
- Drummond, M. J., McCarthy, J. J., Fry, C. S., Esser, K. A., & Rasmussen, B. B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *295*(6), E1333-1340. doi: 10.1152/ajpendo.90562.2008
- Duscha, B. D., Robbins, J. L., Jones, W. S., Kraus, W. E., Lye, R. J., Sanders, J. M., . . . Annex, B. H. (2011). Angiogenesis in skeletal muscle precede improvements in peak oxygen uptake in peripheral artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(11), 2742-2748. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.230441
- Edwards, A. T., Blann, A. D., Suarez-Mendez, V. J., Lardi, A. M., & McCollum, C. N. (1994). Systemic responses in patients with intermittent claudication after treadmill exercise. *Br J Surg*, *81*(12), 1738-1741.
- Edwards, J. M., & Porter, J. M. (1998). Upper extremity arterial disease: etiologic considerations and differential diagnosis. *Semin Vasc Surg*, *11*(2), 60-66.
- Eltzschig, H. K., & Collard, C. D. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, *70*, 71-86. doi: 10.1093/bmb/ldh025
- Emilie, D., Burgard, M., Lascoux-Combe, C., Laughlin, M., Krzysiek, R., Pignon, C., . . . Primoferon, A. S. G. (2001). Early control of HIV replication in primary HIV-1 infection treated with antiretroviral drugs and pegylated IFN alpha: results from the Primoferon A (ANRS 086) Study. *AIDS*, *15*(11), 1435-1437.
- Esau, C., Kang, X., Peralta, E., Hanson, E., Marcusson, E. G., Ravichandran, L. V., . . . Griffey, R. (2004). MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, *279*(50), 52361-52365. doi: 10.1074/jbc.C400438200

- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., . . . Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, *283*(23), 15878-15883. doi: 10.1074/jbc.M800731200
- Fazi, F., & Nervi, C. (2008). MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res*, *79*(4), 553-561. doi: 10.1093/cvr/cvn151
- Fernandes, T., Hashimoto, N. Y., Magalhaes, F. C., Fernandes, F. B., Casarini, D. E., Carmona, A. K., . . . Oliveira, E. M. (2011). Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*, *58*(2), 182-189. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168252
- Fernandes, T., Magalhaes, F. C., Roque, F. R., Phillips, M. I., & Oliveira, E. M. (2012). Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*, *59*(2), 513-520. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185801
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, *18*(1), 4-25. doi: 10.1210/edrv.18.1.0287
- Ferreira, L. F., Campbell, K. S., & Reid, M. B. (2011). N-acetylcysteine in handgrip exercise: plasma thiols and adverse reactions. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, *21*(2), 146-154.
- Ferreira, L. F., & Reid, M. B. (2008). Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue. *J Appl Physiol*, *104*(3), 853-860. doi: 00953.2007
- Fichtlscherer, S., De Rosa, S., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C., . . . Dimmeler, S. (2010). Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*, *107*(5), 677-684. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566
- Fiedler, J., Gupta, S. K., & Thum, T. (2012). MicroRNA-based therapeutic approaches in the cardiovascular system. *Cardiovasc Ther*, *30*(1), e9-e15. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00220.x
- Fish, J. E., Santoro, M. M., Morton, S. U., Yu, S., Yeh, R. F., Wythe, J. D., . . . Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, *15*(2), 272-284. doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.008
- Fontaine, R., Kim, M., & Kieny, R. (1954). [Surgical treatment of peripheral circulation disorders]. *Helv Chir Acta*, *21*(5-6), 499-533.
- Fowkes, F. G., Rudan, D., Rudan, I., Aboyans, V., Denenberg, J. O., McDermott, M. M., . . . Criqui, M. H. (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, *382*(9901), 1329-1340. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61249-0
- Francis, S. E., Goh, K. L., Hodivala-Dilke, K., Bader, B. L., Stark, M., Davidson, D., & Hynes, R. O. (2002). Central roles of alpha5beta1 integrin and fibronectin in vascular development in mouse embryos and embryoid bodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *22*(6), 927-933.
- Fujita, S., Ito, T., Mizutani, T., Minoguchi, S., Yamamichi, N., Sakurai, K., & Iba, H. (2008). miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*, *378*(3), 492-504. doi: 10.1016/j.jmb.2008.03.015
- Gardner, A. W. (1993). Claudication pain and hemodynamic responses to exercise in younger and older peripheral arterial disease patients. *J Gerontol*, *48*(5), M231-236.
- Gardner, A. W., Killewich, L. A., Katzel, L. I., Womack, C. J., Montgomery, P. S., Otis, R. B., & Fonong, T. (1999). Relationship between free-living daily physical activity and peripheral circulation in patients with intermittent claudication. *Angiology*, *50*(4), 289-297.
- Gardner, A. W., Montgomery, P. S., Scott, K. J., Afaq, A., & Blevins, S. M. (2007). Patterns of ambulatory activity in subjects with and without intermittent claudication. *J Vasc Surg*, *46*(6), 1208-1214. doi: S0741-5214(07)01201-3
- Gardner, A. W., Parker, D. E., Montgomery, P. S., & Blevins, S. M. (2014). Step-monitored home exercise improves ambulation, vascular function, and inflammation in symptomatic patients with peripheral artery disease: a randomized controlled trial. *J Am Heart Assoc*, *3*(5), e001107. doi: 10.1161/JAHA.114.001107

- Gardner, A. W., Skinner, J. S., Cantwell, B. W., & Smith, L. K. (1991). Progressive vs single-stage treadmill tests for evaluation of claudication. *Med Sci Sports Exerc*, *23*(4), 402-408.
- Ghosh, G., Subramanian, I. V., Adhikari, N., Zhang, X., Joshi, H. P., Basi, D., . . . Ramakrishnan, S. (2010). Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-alpha isoforms and promotes angiogenesis. *J Clin Invest*, *120*(11), 4141-4154. doi: 10.1172/JCI42980
- Ginter, E., Simko, V., & Panakova, V. (2014). Antioxidants in health and disease. *Bratisl Lek Listy*, *115*(10), 603-606.
- Gliemann, L., Olesen, J., Bienso, R. S., Schmidt, J. F., Akerstrom, T., Nyberg, M., . . . Hellsten, Y. (2014). Resveratrol modulates the angiogenic response to exercise training in skeletal muscles of aged men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *307*(8), H1111-1119. doi: 10.1152/ajpheart.00168.2014
- Goligorsky, M. S. (2010). Microvascular rarefaction: the decline and fall of blood vessels. *Organogenesis*, *6*(1), 1-10.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev*, *83*(3), 731-801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F. V., . . . Vina, J. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, *87*(1), 142-149.
- Green, S. (2002). Haemodynamic limitations and exercise performance in peripheral arterial disease. *Clin Physiol Funct Imaging*, *22*(2), 81-91.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, *123*(4), 631-640. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.022
- Grenon, S. M., Vittinghoff, E., Owens, C. D., Conte, M. S., Whooley, M., & Cohen, B. E. (2013). Peripheral artery disease and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease: insights from the Heart and Soul Study. *Vasc Med*, *18*(4), 176-184. doi: 10.1177/1358863X13493825
- Grundmann, S., Hans, F. P., Kinniry, S., Heinke, J., Helbing, T., Bluhm, F., . . . Moser, M. (2011). MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*, *123*(9), 999-1009. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000323
- Gustafsson, T., Rundqvist, H., Norrbom, J., Rullman, E., Jansson, E., & Sundberg, C. J. (2007). The influence of physical training on the angiotensin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), *103*(3), 1012-1020. doi: 10.1152/jappphysiol.01103.2006
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, *186*, 1-85.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*, *18*(24), 3016-3027. doi: 10.1101/gad.1262504
- Han, W. Q., Zhu, D. L., Wu, L. Y., Chen, Q. Z., Guo, S. J., & Gao, P. J. (2009). N-acetylcysteine-induced vasodilation involves voltage-gated potassium channels in rat aorta. *Life Sci*, *84*(21-22), 732-737. doi: 10.1016/j.lfs.2009.02.023
- Harris, L. M., Faggioli, G. L., Shah, R., Koerner, N., Lillis, L., Dandona, P., . . . Ricotta, J. J. (1995). Vascular reactivity in patients with peripheral vascular disease. *Am J Cardiol*, *76*(3), 207-212.
- Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T., & Lowenstein, C. J. (2008). MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(5), 1516-1521. doi: 10.1073/pnas.0707493105
- Hernandez, A., Cheng, A., & Westerblad, H. (2012). Antioxidants and Skeletal Muscle Performance: "Common Knowledge" vs. Experimental Evidence. *Front Physiol*, *3*, 46. doi: 10.3389/fphys.2012.00046
- Hiatt, W. R., Regensteiner, J. G., Wolfel, E. E., Carry, M. R., & Brass, E. P. (1996). Effect of exercise training on skeletal muscle histology and metabolism in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol*, *81*(2), 780-788.

- Hiatt, W. R., Rogers, R. K., & Brass, E. P. (2014). The treadmill is a better functional test than the 6-minute walk test in therapeutic trials of patients with peripheral artery disease. *Circulation*, *130*(1), 69-78. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007003
- Hickman, P., Harrison, D. K., Hill, A., McLaren, M., Tamei, H., McCollum, P. T., & Belch, J. J. (1994). Exercise in patients with intermittent claudication results in the generation of oxygen derived free radicals and endothelial damage. *Adv Exp Med Biol*, *361*, 565-570.
- Hipertensão, S. B. d. (2010). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Revista Hipertensão*, *13*(1), 1-68.
- Hirsch, A. T., Haskal, Z. J., Hertzner, N. R., Bakal, C. W., Creager, M. A., Halperin, J. L., . . . Riegel, B. (2006). ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation*, *113*(11), e463-654. doi: 113/11/e463
- Hu, G., Gong, A. Y., Liu, J., Zhou, R., Deng, C., & Chen, X. M. (2010). miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon-gamma-induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *298*(4), G542-550. doi: 10.1152/ajpgi.00490.2009
- Humar, R., Kiefer, F. N., Berns, H., Resink, T. J., & Battegay, E. J. (2002). Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J*, *16*(8), 771-780. doi: 10.1096/fj.01-0658com
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., . . . Marsh, C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, *3*(11), e3694. doi: 10.1371/journal.pone.0003694
- Kawashima, T., & Shioi, T. (2011). MicroRNA, emerging role as a biomarker of heart failure. *Circ J*, *75*(2), 268-269.
- Kelly, G. S. (1998). Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev*, *3*(2), 114-127.
- Kemp, G. J., Roberts, N., Bimson, W. E., Bakran, A., Harris, P. L., Gilling-Smith, G. L., . . . Frostick, S. P. (2001). Mitochondrial function and oxygen supply in normal and in chronically ischemic muscle: a combined 31P magnetic resonance spectroscopy and near infrared spectroscopy study in vivo. *J Vasc Surg*, *34*(6), 1103-1110. doi: 10.1067/mva.2001.117152
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(5), 376-385. doi: 10.1038/nrm1644
- Kingwell, K. (2011). Cardiovascular disease: microRNA protects the heart. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(2), 98. doi: 10.1038/nrd3380
- Kirk, G., Hickman, P., McLaren, M., Stonebridge, P. A., & Belch, J. J. (1999). Interleukin-8 (IL-8) may contribute to the activation of neutrophils in patients with peripheral arterial occlusive disease (PAOD). *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *18*(5), 434-438. doi: 10.1053/ejvs.1999.0927
- Koehler, C., Couillard, A., Simar, D., Cristol, J. P., Bellet, H., Hayot, M., & Prefaut, C. (2004). Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med*, *169*(9), 1022-1027. doi: 10.1164/rccm.200310-1465OC
- Kondkar, A. A., & Abu-Amero, K. K. (2015). Utility of circulating microRNAs as clinical biomarkers for cardiovascular diseases. *Biomed Res Int*, *2015*, 821823. doi: 10.1155/2015/821823
- Kroger, K., Stang, A., Kondratieva, J., Moebus, S., Beck, E., Schmermund, A., . . . Heinz Nixdorf Recall Study, G. (2006). Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study. *Eur J Epidemiol*, *21*(4), 279-285. doi: 10.1007/s10654-006-0015-9

- Kuehbach, A., Urbich, C., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, *101*(1), 59-68. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153916
- Kumar, C. C. (1998). Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, *17*(11 Reviews), 1365-1373. doi: 10.1038/sj.onc.1202172
- Lane, R., Ellis, B., Watson, L., & Leng, G. C. (2014). Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*, *7*, CD000990. doi: 10.1002/14651858.CD000990.pub3
- Laurindo, F. R. M. (2003). Desequilíbrio Redox, resposta vascular à lesão e Aterosclerose. In P. L. LUZ, F. R. M. LAURINHO, & A. C. P. CHAGAS (Eds.), *Endotélío* (pp. 115-132).
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419. doi: 10.1038/nature01957
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Li, D., Yang, P., Xiong, Q., Song, X., Yang, X., Liu, L., . . . Rui, Y. C. (2010). MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertens*, *28*(8), 1646-1654. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833a4922
- Li, Q., Xie, J., Wang, B., Li, R., Bai, J., Ding, L., . . . Xu, B. (2016). Overexpression of microRNA-99a Attenuates Cardiac Hypertrophy. *PLoS One*, *11*(2), e0148480. doi: 10.1371/journal.pone.0148480
- Li, W., Petrimpol, M., Molle, K. D., Hall, M. N., Battagay, E. J., & Humar, R. (2007). Hypoxia-induced endothelial proliferation requires both mTORC1 and mTORC2. *Circ Res*, *100*(1), 79-87. doi: 10.1161/01.RES.0000253094.03023.3f
- Liao, J. K., Bettmann, M. A., Sandor, T., Tucker, J. I., Coleman, S. M., & Creager, M. A. (1991). Differential impairment of vasodilator responsiveness of peripheral resistance and conduit vessels in humans with atherosclerosis. *Circ Res*, *68*(4), 1027-1034.
- Lin, M. I., & Sessa, W. C. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling to endothelial nitric oxide synthase: more than a FLeETing moment. *Circ Res*, *99*(7), 666-668. doi: 10.1161/01.RES.0000245430.24075.a4
- Lorentsen, E. (1972). Systemic arterial blood pressure during exercise in patients with atherosclerosis obliterans of the lower limbs. *Circulation*, *46*(2), 257-263.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, *303*(5654), 95-98. doi: 10.1126/science.1090599
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., . . . Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, *277*(5322), 55-60.
- Makdisse, M., Pereira Ada, C., Brasil Dde, P., Borges, J. L., Machado-Coelho, G. L., Krieger, J. E., . . . Chagas, A. C. (2008). Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arq Bras Cardiol*, *91*(6), 370-382. doi: S0066-782X2008001800008 [pii]
- Mangiafico, R. A., Malatino, L. S., Spada, R. S., Santonocito, M., Messina, R., Dell'Arte, S., & Attina, T. (2000). Treadmill exercise-induced release of endothelin-1 in patients with peripheral arterial occlusive disease at Fontaine stage IIb. *Int Angiol*, *19*(1), 14-17.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, *80*(2), 179-185.
- McCarthy, J. J., Esser, K. A., Peterson, C. A., & Dupont-Versteegden, E. E. (2009). Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics*, *39*(3), 219-226. doi: 10.1152/physiolgenomics.00042.2009
- McCully, K. K., Halber, C., & Posner, J. D. (1994). Exercise-induced changes in oxygen saturation in the calf muscles of elderly subjects with peripheral vascular disease. *J Gerontol*, *49*(3), B128-134.
- McDermott, M. M., Ferrucci, L., Liu, K., Criqui, M. H., Greenland, P., Green, D., . . . Vonesh, E. (2005). D-dimer and inflammatory markers as predictors of functional decline in men and women with and without peripheral arterial disease. *J Am Geriatr Soc*, *53*(10), 1688-1696. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53510.x

- McDermott, M. M., Greenland, P., Green, D., Guralnik, J. M., Criqui, M. H., Liu, K., . . . Fornage, M. (2003). D-dimer, inflammatory markers, and lower extremity functioning in patients with and without peripheral arterial disease. *Circulation*, *107*(25), 3191-3198. doi: 10.1161/01.CIR.0000074227.53616.CC
- Melov, S., Shoffner, J. M., Kaufman, A., & Wallace, D. C. (1995). Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*, *23*(20), 4122-4126.
- Merlet, J., Burger, J., Gomes, J. E., & Pintard, L. (2009). Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cell Mol Life Sci*, *66*(11-12), 1924-1938. doi: 10.1007/s00018-009-8712-7
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., . . . Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(30), 10513-10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105
- Montgomery, R. L., & van Rooij, E. (2011). Therapeutic advances in MicroRNA targeting. *J Cardiovasc Pharmacol*, *57*(1), 1-7. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181f603d0
- Moylan, J. S., & Reid, M. B. (2007). Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve*, *35*(4), 411-429. doi: 10.1002/mus.20743
- Munzel, T., Gori, T., Bruno, R. M., & Taddei, S. (2010). Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J*, *31*(22), 2741-2748. doi: 10.1093/eurheartj/ehq396
- Nakamachi, Y., Kawano, S., Takenokuchi, M., Nishimura, K., Sakai, Y., Chin, T., . . . Kumagai, S. (2009). MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *60*(5), 1294-1304. doi: 10.1002/art.24475
- Nassoura, Z. E., Ivatury, R. R., Simon, R. J., Jabbour, N., Vinzons, A., & Stahl, W. (1996). A reassessment of Doppler pressure indices in the detection of arterial lesions in proximity penetrating injuries of extremities: a prospective study. *Am J Emerg Med*, *14*(2), 151-156. doi: 10.1016/S0735-6757(96)90122-9
- Neumann, F. J., Waas, W., Diehm, C., Weiss, T., Haupt, H. M., Zimmermann, R., . . . Kubler, W. (1990). Activation and decreased deformability of neutrophils after intermittent claudication. *Circulation*, *82*(3), 922-929.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, A. R., Pedersen, B. K., & Laye, M. J. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*, *588*(Pt 20), 4029-4037. doi: 10.1113/jphysiol.2010.189860
- Norgren, L., Hiatt, W. R., Dormandy, J. A., Nehler, M. R., Harris, K. A., Fowkes, F. G., . . . Group, T. I. W. (2007). Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol*, *26*(2), 81-157.
- Nowak, W. N., Mika, P., Nowobilski, R., Kusinska, K., Bukowska-Strakova, K., Nizankowski, R., . . . Dulak, J. (2012). Exercise training in intermittent claudication: effects on antioxidant genes, inflammatory mediators and proangiogenic progenitor cells. *Thromb Haemost*, *108*(5), 824-831. doi: 10.1160/TH12-04-0278
- Nozawa, M., Miura, S., & Nei, M. (2012). Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol*, *4*(3), 230-239. doi: 10.1093/gbe/evs002
- O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(5), 1604-1609. doi: 10.1073/pnas.0610731104
- Olamaei, N., Dupuis, J., Ngo, Q., Finnerty, V., Vo Thang, T. T., Authier, S., . . . Harel, F. (2010). Characterization and reproducibility of forearm arterial flow during reactive hyperemia. *Physiol Meas*, *31*(6), 763-773. doi: 10.1088/0967-3334/31/6/003
- Olena, A. F., & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, *222*(3), 540-545. doi: 10.1002/jcp.21993
- Palmer-Kazen, U., Religa, P., & Wahlberg, E. (2009). Exercise in patients with intermittent claudication elicits signs of inflammation and angiogenesis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *38*(6), 689-696. doi: S1078-5884(09)00435-3
- Palmer-Kazen, U., Wariaro, D., Luo, F., & Wahlberg, E. (2004). Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*, *39*(3), 621-628. doi: 10.1016/j.jvs.2003.07.006

- Pande, R. L., Brown, J., Buck, S., Redline, W., Doyle, J., Plutzky, J., & Creager, M. A. (2015). Association of monocyte tumor necrosis factor alpha expression and serum inflammatory biomarkers with walking impairment in peripheral artery disease. *J Vasc Surg*, *61*(1), 155-161. doi: 10.1016/j.jvs.2014.06.116
- Paulsen, G., Cumming, K. T., Holden, G., Hallen, J., Ronnestad, B. R., Sveen, O., . . . Raastad, T. (2014). Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial. *J Physiol*, *592*(8), 1887-1901. doi: 10.1113/jphysiol.2013.267419
- Petersen, A. C., McKenna, M. J., Medved, I., Murphy, K. T., Brown, M. J., Della Gatta, P., & Cameron-Smith, D. (2012). Infusion with the antioxidant N-acetylcysteine attenuates early adaptive responses to exercise in human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, *204*(3), 382-392. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02344.x
- Pieper, G. M., & Siebeneich, W. (1998). Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, *32*(1), 101-105.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., . . . Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, *309*(5740), 1573-1576. doi: 10.1126/science.1115079
- Pipinos, II, Judge, A. R., Selsby, J. T., Zhu, Z., Swanson, S. A., Nella, A. A., & Dodd, S. L. (2008). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type. *Vasc Endovascular Surg*, *42*(2), 101-112. doi: 1538574408315995
- Pipinos, II, Judge, A. R., Zhu, Z., Selsby, J. T., Swanson, S. A., Johanning, J. M., . . . Dodd, S. L. (2006). Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med*, *41*(2), 262-269. doi: S0891-5849(06)00246-2
- Pipinos, II, Swanson, S. A., Zhu, Z., Nella, A. A., Weiss, D. J., Gutti, T. L., . . . Casale, G. P. (2008). Chronically ischemic mouse skeletal muscle exhibits myopathy in association with mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *295*(1), R290-296. doi: 90374.2008 [pii]
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K., . . . Rainaldi, G. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, *108*(9), 3068-3071. doi: 10.1182/blood-2006-01-012369
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & DeRuisseau, K. C. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *288*(2), R337-344. doi: 10.1152/ajpregu.00469.2004
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & McClung, J. M. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, *102*(6), 2389-2397. doi: 10.1152/jappphysiol.01202.2006
- Prasad, A., Andrews, N. P., Padder, F. A., Husain, M., & Quyyumi, A. A. (1999). Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol*, *34*(2), 507-514.
- Prior, B. M., Yang, H. T., & Terjung, R. L. (2004). What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*, *97*(3), 1119-1128. doi: 10.1152/jappphysiol.00035.2004
- Ramasamy, S., Velmurugan, G., Shanmugha Rajan, K., Ramprasath, T., & Kalpana, K. (2015). MiRNAs with apoptosis regulating potential are differentially expressed in chronic exercise-induced physiologically hypertrophied hearts. *PLoS One*, *10*(3), e0121401. doi: 10.1371/journal.pone.0121401
- Ridker, P. M. (2001). Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet*, *358*(9286), 946-948. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06112-8
- Ringholm, S., Bienso, R. S., Kiilerich, K., Guadalupe-Grau, A., Aachmann-Andersen, N. J., Saltin, B., . . . Pilegaard, H. (2011). Bed rest reduces metabolic protein content and abolishes exercise-induced mRNA responses in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *301*(4), E649-658. doi: 10.1152/ajpendo.00230.2011
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., . . . Bluher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(21), 8665-8670. doi: 10.1073/pnas.0903485106

- Rose, G. A. (1962). The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bull World Health Organ*, 27, 645-658.
- Roseguini, B. T., Silva, N.; Chehuen, M.R.; Costa, L.R.; Matsumoto, P.K.; Han, S.W.; Forjaz, C.M.; Wolosker, N. (2014). *Effect of N-acetylcysteine on walking tolerance, vascular reactivity and inflammation In patients with intermittent claudication*. Paper presented at the American College of Sports Medicine Annual Meeting, Orlando - Florida.
- Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B. P., & Tarnopolsky, M. A. (2009). miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One*, 4(5), e5610. doi: 10.1371/journal.pone.0005610
- Sahin, G., Yalcin, A. U., & Akcar, N. (2007). Effect of N-acetylcysteine on endothelial dysfunction in dialysis patients. *Blood Purif*, 25(4), 309-315. doi: 10.1159/000106103
- Sanada, H., Higashi, Y., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M., & Sueda, T. (2005). Vascular function in patients with lower extremity peripheral arterial disease: a comparison of functions in upper and lower extremities. *Atherosclerosis*, 178(1), 179-185. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.013
- Sandri, M., Beck, E. B., Adams, V., Gielen, S., Lenk, K., Holtriegel, R., . . . Schuler, G. (2011). Maximal exercise, limb ischemia, and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 18(1), 55-64. doi: 10.1097/HJR.0b013e32833ba654
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30(11), 1191-1212.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 67(1-2), 183-195. doi: 10.1007/s11103-008-9310-z
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398), 843-845. doi: 10.1038/359843a0
- Sies, H., Stahl, W., & Sevanian, A. (2005). Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr*, 135(5), 969-972.
- Signorelli, S. S., Li Volsi, G., Pitruzzella, A., Fiore, V., Mangiafico, M., Vanella, L., . . . Li Volti, G. (2016). Circulating miR-130a, miR-27b, and miR-210 in Patients With Peripheral Artery Disease and Their Potential Relationship With Oxidative Stress: A Pilot Study. *Angiology*. doi: 10.1177/00033197166638242
- Signorelli, S. S., Mazzarino, M. C., Di Pino, L., Malaponte, G., Porto, C., Pennisi, G., . . . Virgilio, V. (2003). High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNFalpha), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test. *Vasc Med*, 8(1), 15-19.
- Silveira, L. R., Pilegaard, H., Kusuhara, K., Curi, R., & Hellsten, Y. (2006). The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*, 1763(9), 969-976. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.06.010
- Silvestro, A., Schiano, V., Bucur, R., Brevetti, G., Scopacasa, F., & Chiariello, M. (2006). Effect of propionylcarnitine on changes in endothelial function and plasma levels of adhesion molecules induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Angiology*, 57(2), 145-154.
- Silvestro, A., Scopacasa, F., Oliva, G., de Cristofaro, T., Iuliano, L., & Brevetti, G. (2002). Vitamin C prevents endothelial dysfunction induced by acute exercise in patients with intermittent claudication. *Atherosclerosis*, 165(2), 277-283.
- Slattery, K. M., Dascombe, B., Wallace, L. K., Bentley, D. J., & Coutts, A. J. (2014). Effect of N-acetylcysteine on cycling performance after intensified training. *Med Sci Sports Exerc*, 46(6), 1114-1123. doi: 10.1249/MSS.0000000000000222
- Soci, U. P., Fernandes, T., Hashimoto, N. Y., Mota, G. F., Amadeu, M. A., Rosa, K. T., . . . Oliveira, E. M. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*, 43(11), 665-673. doi: 10.1152/physiolgenomics.00145.2010

- Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., & Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(8), 2746-2751. doi: 10.1073/pnas.0511045103
- Sorlie, D., & Myhre, K. (1978). Lower leg blood flow in intermittent claudication. *Scand J Clin Lab Invest*, *38*(2), 171-179.
- Stather, P. W., Sylvius, N., Sidloff, D. A., Dattani, N., Verissimo, A., Wild, J. B., . . . Bown, M. J. (2015). Identification of microRNAs associated with abdominal aortic aneurysms and peripheral arterial disease. *Br J Surg*, *102*(7), 755-766. doi: 10.1002/bjs.9802
- Stather, P. W., Sylvius, N., Wild, J. B., Choke, E., Sayers, R. D., & Bown, M. J. (2013). Differential microRNA expression profiles in peripheral arterial disease. *Circ Cardiovasc Genet*, *6*(5), 490-497. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.000053
- Suarez, Y., Wang, C., Manes, T. D., & Pober, J. S. (2010). Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol*, *184*(1), 21-25. doi: 10.4049/jimmunol.0902369
- Thum, T., Catalucci, D., & Bauersachs, J. (2008). MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*, *79*(4), 562-570. doi: 10.1093/cvr/cvn137
- Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., . . . Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*, *179*(8), 5082-5089.
- Tisi, P. V., Hulse, M., Chulakadabba, A., Gosling, P., & Shearman, C. P. (1997). Exercise training for intermittent claudication: does it adversely affect biochemical markers of the exercise-induced inflammatory response? *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *14*(5), 344-350.
- Tisi, P. V., & Shearman, C. P. (1998). Biochemical and inflammatory changes in the exercising claudicant. *Vasc Med*, *3*(3), 189-198.
- Tsui, J. C., Baker, D. M., Biecker, E., Shaw, S., & Dashwood, M. R. (2002). Potential role of endothelin 1 in ischaemia-induced angiogenesis in critical leg ischaemia. *Br J Surg*, *89*(6), 741-747. doi: 10.1046/j.1365-2168.2002.02100.x
- Tsui, J. C., Baker, D. M., Biecker, E., Shaw, S., & Dashwood, M. R. (2004). Altered endothelin-1 levels in acute lower limb ischemia and reperfusion. *Angiology*, *55*(5), 533-539.
- Tsui, J. C., & Dashwood, M. R. (2005). A role for endothelin-1 in peripheral vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*, *3*(4), 325-332.
- Turton, E. P., Coughlin, P. A., Kester, R. C., & Scott, D. J. (2002). Exercise training reduces the acute inflammatory response associated with claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, *23*(4), 309-316. doi: 10.1053/ejvs.2002.1599
- Ueki, K., Fruman, D. A., Yballe, C. M., Fasshauer, M., Klein, J., Asano, T., . . . Kahn, C. R. (2003). Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*, *278*(48), 48453-48466. doi: 10.1074/jbc.M305602200
- Uhlemann, M., Mobius-Winkler, S., Fikenzer, S., Adam, J., Redlich, M., Mohlenkamp, S., . . . Adams, V. (2014). Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol*, *21*(4), 484-491. doi: 10.1177/2047487312467902
- Ungvari, Z., Tucsek, Z., Sosnowska, D., Toth, P., Gautam, T., Podlutzky, A., . . . Csiszar, A. (2013). Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microRNA expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *68*(8), 877-891. doi: 10.1093/gerona/gls242
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, *20*(5), 515-524. doi: 10.1101/gad.1399806
- van Rooij, E., Marshall, W. S., & Olson, E. N. (2008). Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res*, *103*(9), 919-928. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183426
- van Solingen, C., Seghers, L., Bijkerk, R., Duijs, J. M., Roeten, M. K., van Oeveren-Rietdijk, A. M., . . . van Zonneveld, A. J. (2009). Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*, *13*(8A), 1577-1585. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00613.x

- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, *13*(4), 423-433. doi: 10.1038/ncb2210
- Vita, J. A., & Hamburg, N. M. (2010). Does endothelial dysfunction contribute to the clinical status of patients with peripheral arterial disease? *Can J Cardiol*, *26 Suppl A*, 45A-50A.
- von Ziegler, F., & Costa, M. A. (2007). The role of CT and MRI in the assessment of peripheral vascular disease. *Curr Cardiol Rep*, *9*(5), 412-419.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, *38*(20), 7248-7259. doi: 10.1093/nar/gkq601
- Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., . . . Olson, E. N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, *15*(2), 261-271. doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.002
- Wang, X. H., Qian, R. Z., Zhang, W., Chen, S. F., Jin, H. M., & Hu, R. M. (2009). MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *36*(2), 181-188. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.05057.x
- Wardle, S. L., Bailey, M. E., Kilikevicius, A., Malkova, D., Wilson, R. H., Venckunas, T., & Moran, C. N. (2015). Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. *PLoS One*, *10*(4), e0122107. doi: 10.1371/journal.pone.0122107
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., . . . Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, *56*(11), 1733-1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405
- Widera, C., Gupta, S. K., Lorenzen, J. M., Bang, C., Bauersachs, J., Bethmann, K., . . . Thum, T. (2011). Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol*, *51*(5), 872-875. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.011
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, *75*(5), 855-862.
- Wijnen, M. H., Coolen, S. A., Vader, H. L., Reijenga, J. C., Huf, F. A., & Roumen, R. M. (2001). Antioxidants reduce oxidative stress in claudicants. *J Surg Res*, *96*(2), 183-187. doi: 10.1006/jsre.2000.6078
- Wilkinson, I. B., & Webb, D. J. (2001). Venous occlusion plethysmography in cardiovascular research: methodology and clinical applications. *Br J Clin Pharmacol*, *52*(6), 631-646.
- Williams, A. E., Perry, M. M., Moschos, S. A., Larner-Svensson, H. M., & Lindsay, M. A. (2008). Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer. *Biochem Soc Trans*, *36*(Pt 6), 1211-1215. doi: 10.1042/BST0361211
- Wolosker, N., Nakano, L., Rosoky, R. A., & Puech-Leao, P. (2003). Evaluation of walking capacity over time in 500 patients with intermittent claudication who underwent clinical treatment. *Arch Intern Med*, *163*(19), 2296-2300. doi: 10.1001/archinte.163.19.2296
- Wood, R. E., Sanderson, B. E., Askew, C. D., Walker, P. J., Green, S., & Stewart, I. B. (2006). Effect of training on the response of plasma vascular endothelial growth factor to exercise in patients with peripheral arterial disease. *Clin Sci (Lond)*, *111*(6), 401-409. doi: 10.1042/CS20060151
- Wu, F., Yang, Z., & Li, G. (2009). Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, *386*(4), 549-553. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.075
- Xia, Z., Liu, M., Wu, Y., Sharma, V., Luo, T., Ouyang, J., & McNeill, J. H. (2006). N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression. *Eur J Pharmacol*, *550*(1-3), 134-142. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.08.044
- Yang, J. T., Rayburn, H., & Hynes, R. O. (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development*, *119*(4), 1093-1105.
- Yang, W. J., Yang, D. D., Na, S., Sandusky, G. E., Zhang, Q., & Zhao, G. (2005). Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem*, *280*(10), 9330-9335. doi: 10.1074/jbc.M413394200

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24), 3011-3016. doi: 10.1101/gad.1158803
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., . . . Weber, C. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2(100), ra81. doi: 10.1126/scisignal.2000610
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., . . . Zhang, C. Y. (2010). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*, 39(1), 133-144. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.010
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., . . . Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60(6), 1541-1545.
- Zhu, N., Zhang, D., Chen, S., Liu, X., Lin, L., Huang, X., . . . Qin, Y. (2011). Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*, 215(2), 286-293. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.024
- Zicha, J., Dobesova, Z., & Kunes, J. (2006). Antihypertensive mechanisms of chronic captopril or N-acetylcysteine treatment in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res*, 29(12), 1021-1027. doi: 10.1291/hypres.29.1021