

EPIGENÉTICA E RISCO CARDIOVASCULAR: BIOMARCADORES PROMISSORES PARA DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO

Abraão Telles Rocha;
Clara Machado Rodrigues;
Fernando Silva Santos;
Jaqueline Rossi Marim;
Lee Anderson Cruvinel Campos;
Marianne Basseto Braga Araujo;
Renard Fernandes Dias;
Valesca Antunes Marques;
Graziella Tarsitano Wiggert;
Marcus Vinicius Iglesias de Souza

Resumo Os biomarcadores epigenéticos têm emergido como ferramentas promissoras na predição de eventos cardiovasculares, proporcionando uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes às doenças cardiovasculares (DCV). A epigenética estuda modificações hereditárias na expressão gênica sem alteração na sequência do DNA, sendo os principais mecanismos envolvidos a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e a regulação por RNA não codificante, como microRNAs (miRNAs) e longos RNAs não codificantes (lncRNAs). A metilação do DNA, por exemplo, desempenha um papel essencial na regulação de genes associados à inflamação, estresse oxidativo e disfunção endotelial, processos centrais na aterosclerose. Estudos demonstram que padrões específicos de metilação em genes como *LINE-1* e *APOE* estão associados a maior risco cardiovascular. Da mesma forma, modificações nas histonas, como a acetilação e metilação de H3K27 e H3K9, afetam a expressão de genes relacionados à homeostase vascular. Além disso, miRNAs e lncRNAs regulam processos essenciais na progressão da aterosclerose e insuficiência cardíaca. Por exemplo, o miR-126 está envolvido na angiogênese e proteção endotelial, enquanto o miR-21 tem sido associado à fibrose cardíaca e hipertrofia ventricular. Esses biomarcadores epigenéticos são detectáveis em fluidos biológicos, como sangue e saliva, possibilitando o desenvolvimento de testes não invasivos para estratificação de risco cardiovascular. A aplicabilidade clínica desses biomarcadores ainda enfrenta desafios, como a padronização de métodos de detecção e a validação de sua utilidade preditiva em diferentes populações. No entanto, a integração de biomarcadores epigenéticos com outros indicadores clínicos e genéticos poderá revolucionar a medicina personalizada, permitindo estratégias preventivas mais eficazes para pacientes em risco de eventos cardiovasculares adversos.

Palavras-chave: Biomarcadores. Epigenética. Doenças cardiovasculares. Metilação do DNA. MicroRNAs.

1. BREVE HISTÓRIA DA EPIGENÉTICA

Em 1942, biólogo inglês C.H. Waddington propôs, pela primeira vez, o uso do termo epigenética, que significa mudanças em sequências não genéticas. Na década de 1980, o biólogo molecular britânico R Holliday reformulou sistematicamente o termo em um artigo acadêmico, a partir do consenso de que a metilação do DNA pode alterar a atividade do gene¹. Em 1990, ele redefiniu a epigenética como o estudo dos mecanismos temporais e espaciais, pelos quais os genes atuam durante o desenvolvimento de organismos complexos². Uma nova definição ocorreu em 1996, quando o geneticista americano Athur D. Riggs e outros pesquisadores consideraram a epigenética como as mudanças genéticas causadas por mitose ou meiose na função dos genes sem alterar a sequência genética^{3,4}. O ajuste estrutural da região cromossômica, que faz com que ela se expresse, emita sinal ou mantenha um estado de atividade alterado, foi a definição encontrada, em 2007, pelo geneticista britânico SA Bird⁵.

Em uma conferência de Spring Harbor, realizada em 2008, a natureza da epigenética foi reconhecida como alterações cromossômicas que causaram fenótipo hereditário estável na ausência de alterações na ordem do DNA. Com a extensão das pesquisas nessa área, o National Institutes of Health (NIH), em 2013, consideraram que a epigenética incluía alterações herdadas na atividade e expressão gênica de células ou indivíduos e mudanças estáveis, de longo prazo e não herdadas no nível potencial de transcrição celular. Atualmente, o conceito amplamente

aceito da epigenética é o estudo dos processos moleculares herdáveis que afetam a expressão gênica sem causar mudanças na sequência de bases na molécula de DNA⁶.

Os mecanismos epigenéticos são descobertos e amplamente aceitos, pois regulam a expressão gênica, sem alterar a sequência de DNA por modificações covalentes feitas em proteínas histonas e ácidos nucleicos, que regulam cooperativamente a estrutura da cromatina. As regulações epigenéticas são reversíveis e dinamicamente reguladas pela expressão gênica. Isso indica que os mecanismos epigenéticos podem desempenhar papéis mais importantes na biologia. Também abre a possibilidade de desenvolver medicamentos epigenéticos para determinadas doenças⁶.

2. MECANISMOS REGULATÓRIOS EPIGENÉTICOS

2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma modificação normal e universal em células eucarióticas. É também a principal forma epigenética de regulação da expressão gênica em mamíferos. Existem várias formas de modificação metilada, mas a maioria delas ocorre em ilhas de citosina fosfato guanina (CpG) na região promotora do gene. A metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético. Ela pode transferir informações genéticas para o DNA da prole por meio da regulação das metiltransferases de DNA (DNMTs)⁷.

As DNA metilases podem ser divididas em três categorias de acordo com seus papéis na metilação do DNA: enzimas *writers*, enzimas *erasers* e enzimas *readers*. As enzimas *writers* catalisam a adição de grupos metil aos resíduos de citosina, incluindo DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. Embora essas enzimas tenham grande domínio regulatório N-terminal e domínio catalítico c-terminal, existem diferenças nos padrões de função e expressão⁷.

O DNMT1 pode não apenas imitar com precisão o padrão de metilação original antes da replicação do DNA, mas também reparar a metilação do DNA⁸. Também conhecidos como DNMT de novo, o DNMT3a e o DNMT3b podem introduzir metilação no DNA nu e estabelecer um novo padrão de metilação para o DNA não modificado. Direcionados a sequências específicas de DNA, eles podem ser mediados por fatores de transcrição. Além disso, regulam a metilação do DNA sintético de novo. Os DNMTs podem se ligar a componentes de fatores de transcrição ou complexos repressores para direcionar a metilação do DNA. A ligação do fator de transcrição é capaz de ajudar a proteger os locais CpG da metilação de novo. A função da enzima *eraser* é modificar e remover grupos metil⁹.

A desmetilação do DNA pode ocorrer ativa ou passivamente. A desmetilação passiva significa que a manutenção de DNMTs durante a mitose não consegue metilar a fita de DNA recém-sintetizada. No entanto, o mecanismo molecular que catalisa a desmetilação ativa do DNA não foi elucidado. As enzimas *readers*, por sua vez, podem reconhecer e ligar grupos metil para afetar a expressão gênica. As proteínas no domínio estrutural das enzimas de leitura (adaptadores) estão envolvidas principalmente na expressão gênica. A principal função desses domínios estruturais é recrutar fatores relacionados ao progresso do metabolismo do DNA, incluindo replicação do DNA, transcrição, recombinação do DNA e reparo de danos ao DNA⁹.

Três famílias de proteínas reconhecem a metilação do DNA: a proteína do domínio de ligação ao metil-CPG (MBD), a proteína UHRF e a proteína dedo de zinco. A proteína MBD contém um domínio de ligação metil-CPG (MBD) conservado, que tem uma alta afinidade por um único sítio CpG metilado, enquanto a família MBD inclui MeCP2, a primeira proteína de ligação a metila a ser identificada, assim como MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4^{10,11}. A família de proteínas UHRF mantém a metilação do DNA ligando-se ao DNMT1, visando o DNA semimetilado e a família de proteínas dedo de zinco consiste em Kaiso, ZBTB4 e ZBTB38, que inibem a transcrição de modo dependente da metilação do DNA^{12,13}.

2.2 Modificação de histonas

A modificação de histonas se refere a um processo relacionado à metilação, acetilação, fosforilação, adenilação, ubiquitinação e ribosilação de difosfato de adenosina, sob a ação de enzimas relacionadas. Pode alterar o estado solto ou aglutinante da cromatina, afetando a afinidade entre as histonas e as fitas duplas de DNA. A regulação gênica também pode influenciar a afinidade entre outros fatores de transcrição e promotores de genes estruturais. Entre eles, a metilação e a acetilação de histonas são bem estudadas¹⁴.

2.2.1 Metilação de histonas

A metilação das histonas é uma das modificações pós-transcricionais mais importantes. A histona metiltransferase está envolvida na regulação da metilação das histonas, que transfere grupos metil para resíduos de histonas lisina usando S-adenosina metionina como substrato. O sítio de metilação está no átomo de N da cadeia lateral de lisina e arginina. A metilação comum de histonas inclui metilação H3K4, metilação H3K9 e metilação H3K27. A metilação da lisina é relativamente estável na regulação da expressão gênica, enquanto a metilação dos resíduos de lisina, no quarto sítio de H3, está associada à ativação gênica e a metilação dos resíduos de lisina, no 9º e 27º sítios, ao silenciamento gênico¹⁵.

A metilação da histona arginina é um marcador relativamente dinâmico, relacionada à ativação gênica. A perda de metilação da arginina em H3 e H4 tem relação com o silenciamento gênico. A metilação da histona H3K4 se concentra principalmente em regiões de transcrição ativa, como o local de início da transcrição, regiões promotoras e intensificadoras. H3K4me1 foi enriquecido na região intensificadora e correlacionado com H3K27ac ou H3K27me3, marcando potenciadores ativos ou inibitórios, respectivamente¹⁵. A metilação da histona H3K9, especialmente H3K9me2 e histona 3 lisina 9 trimetilada (H3K9me3), geralmente regula a formação de heterocromatina e a inibição gênica. SUV39H1 e SUV39H2, por sua vez, catalisam a formação de H3K9me2 e H3K9me3. O intensificador do zeste homólogo-2 (EZH2) pode metilar H3K27, causando silenciamento de genes relacionados^{16,17}.

2.2.2 Acetilação de histonas

A acetilação das histonas ocorre nos locais de lisina mais conservados no terminal N de H3 e H4. É coordenado por histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDACs). A acetilação pode regular a transcrição gênica por meio de seus efeitos nas cargas de histonas e proteínas que interagem. Portanto, a acetilação de histonas é considerada um marcador ativo de histonas. Em 1996, os pesquisadores descobriram o HAT P300 e a proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico (CBP). O CBP se liga ao P300 para formar o complexo CBP/P300, que recruta outros HAT, como o PCAF (fator relacionado ao P300/CBP). Segundo as semelhanças estruturais e substratos das moléculas de HDAC, a família HDACs pode ser dividida em quatro categorias, sendo os HDAC1, 2, 3 e 8 pertencentes a proteínas semelhantes a RPD3 de classe I; os HDACs de classe II, divididos em duas subclasses: Classe IIa (HDAC4, 5, 7 e 9) e Classe IIb (HDAC6 e HDAC10); os HDACs de classe III, que são desacetilases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), incluindo sirtuína (SIRT)1-SIRT7; e a proteína de classe IV, correspondente ao HDAC11¹⁸.

Existem muitos resíduos de lisina nas histonas que podem ser acetilados, como H3K4, H3K9, H3K27, entre outros. A acetilação da lisina regula as mudanças funcionais nas proteínas, alterando sua estrutura ou afinidade por outros parceiros de ligação. Portanto, a acetilação da lisina pode regular o câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças^{19,20}. Na lisina acetiltransferase (KATs), o P300 é um coativador de transcrição, que regula a expressão gênica ativando o KAT intrínseco. Além disso, descobriu-se que os HDACs desempenham um papel importante nos processos patológicos de inflamação, hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca²¹⁻²³.

2.3 RNAs não codificantes

Os RNAs não codificantes correspondem a RNAs que não codificam proteínas, incluindo RNAs ribossômicos, RNAs de transporte, pequenos RNAs nucleares, pequenos RNAs nucleolares, microRNAs (miRNAs), mRNA e outras funções conhecidas, bem como aqueles com funções desconhecidas. Esses RNAs têm uma característica comum: podem ser transcritos do genoma, mas não traduzidos em proteínas, desempenhando suas respectivas funções biológicas no nível do RNA. Os RNAs não codificantes são divididos em três categorias, de acordo com seu comprimento²⁴:

- <50 nt – miRNA, pequenos RNAs interferentes, entre outros;
- 50–500 nt – RNA ribossômico, RNA de transporte, RNA nuclear pequeno, RNA nucleolar pequeno, entre outros;
- >500 nt – ncRNAs longos semelhantes a mRNA, RNAs longos não codificantes (lncRNAs) sem caudas de poliadenilato, entre outros.

2.3.1 miRNAs

Os miRNAs são uma classe importante de pequenos ncRNAs, com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, encontrados em animais, plantas e alguns vírus. A maioria dos

genes de miRNAs é transcrita pela RNA polimerase II (Pol II) em grandes miRNAs primários (PRI-miRNAs), que contêm uma ou várias estruturas de anel de tronco, cada uma consistindo de cerca de 70 nucleotídeos. Os miRNAs desempenham um papel na regulação pós-transcricional da expressão gênica²⁴.

Os níveis de transcrição são regulados por modificações epigenéticas específicas do tecido. Assim, os genes de miRNA não são apenas alvos de modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, mas também reguladores de DNMTs e HDACs²⁴. Os miRNAs não só ocupam uma posição importante na progressão de DCVs, como a hipertrofia cardíaca e a fibrose das células miocárdicas, como também a hipertrofia cardíaca. Os miRNAs também podem servir como alvos terapêuticos para doenças^{25,26}.

2.3.2 LncRNAs

LncRNAs são nucleotídeos com mais de 200 de comprimento, que não podem ser convertidos em proteínas. São baseados no mecanismo de função, divididos em ncRNAs ativados com propriedades semelhantes a intensificadores (ncRNA-a); RNAs endógenos competitivos (ceRNAs); transcritos primários para mi- e piRNAs. Os NcRNAs-a regulam positivamente os genes próximos, que são a principal diferença dos RNAs intensificadores (eRNAs). Os ceRNAs compartilham uma sequência com o transcrito que codifica a proteína e podem se ligar competitivamente às suas moléculas reguladas, para desempenhar uma melhor sua função²⁷.

O LncRNA regula os padrões de expressão gênica, alterando a estrutura da cromatina e a acessibilidade ao DNA, por meio de mecanismos moleculares, como sinalização e orientação²⁸. Os LncRNAs, por sua vez, têm alta especificidade funcional ao participarem e regularem vários processos celulares, como metilação do DNA e modificação de histonas²⁹. Além disso, os LncRNAs não apenas regulam as DCVs, mas também são cada vez mais importantes na progressão de doenças relacionadas ao sangue²⁸.

2.3.3 RNAs circulares

Os RNAs circulares (CirRNAs) são moléculas de RNA endógenas longas e não codificantes, com loops de RNA covalentemente fechados de fita simples, sem extremidades 5'-Cap e 3'-poli(A). Com o desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento, vários tipos de cirRNAs foram descobertos e identificados. Existem quatro subtipos principais³⁰:

- cirRNAs de éxons (ecircRNAs), derivados de éxons únicos ou múltiplos;
- cirRNAs circulares do tipo íntron, que contêm apenas íntrons;
- cirRNAs do tipo éxon íntron (ElciRNAs), que consistem em éxons e íntrons.

Atualmente, a maioria dos cirRNAs identificados são ecircRNAs.

Dados sugerem que cirRNAs exercem suas funções regulatórias, por meio dos seguintes mecanismos³¹:

- Atuando como esponjas de miRNA – os cirRNAs regulam a expressão de genes-alvo e a tradução de mRNA, interagindo com o miRNA;
- Como um andaime de proteína – os cirRNAs podem se ligar a proteínas de ligação ao RNA ou proteínas funcionais para regular sua função e transporte;
- Como uma importante molécula de regulação transcricional – CircEIF3J e circPAIP2 interagem com os complexos U1snRNA e RNA polimerase II para aumentar a atividade transcricional;
- Como um modelo para a síntese de proteínas – pode participar da tradução de proteínas.

Os cirRNAs são difundidos e diversos em células eucarióticas, mas relativamente estáveis no citoplasma^{32,33}. Podem ser co-transcritos e pós-transcritos, por um processo de splicing reverso ou splicing circular cabeça-cauda, no qual o éxon a jusante se une na ordem inversa ao éxon a montante³⁴. Além disso, se transformam em RNA linear, visando o miRNA e regulando a expressão gênica. O cirRNA é mais estável do que as isoformas lineares de RNA, pois não possui um terminal acessível que possa resistir à exonuclease do RNA. Considera-se que o mecanismo funcional do cirRNA é alterar o nível de miRNA livre em esponjas, interagindo com o miRNA e, em seguida, regulando a expressão de proteínas relacionadas à doença. Ele também está envolvido na regulação da progressão de DCVs e autoimunes. Portanto, pode ser usado como uma das estratégias potenciais para diagnóstico clínico e tratamento de doenças³⁵.

3. MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A DCV continua sendo a principal causa de morte no mundo, e métodos mais sensíveis e escaláveis para detectar o risco precoce e sua presença são necessários para melhor prevenir e melhorar a sobrevivência de eventos cardiovasculares. Pesquisas mostraram que métodos de diagnóstico baseados em inteligência artificial (IA), combinados com efeitos epigenéticos (metilação de DNA), podem ser traduzidos em métodos clinicamente aplicáveis³⁶. Estudos mostraram a importância das modificações epigenéticas no desenvolvimento de DCVs³⁷⁻⁴⁰.

Ao longo dos anos, foi descoberta uma forte associação entre modificações epigenéticas e a expressão de genes reguladores em inúmeras doenças, incluindo doença cardíaca congênita, cardiomiopatia, hipertensão e aterosclerose. Importante mencionar que terminologias técnicas, como modificações epigenéticas, devem ser definidas quando usadas pela primeira vez. O mecanismo e o desenvolvimento de DCVs envolvem o status de modificação epigenética anormal dos principais genes reguladores. Esses genes podem ser alvos para avaliar a progressão de doenças cardiovasculares⁶.

A doença cardíaca congênita (CHD) surge de anomalias no coração e na formação de grandes vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário, apresentando uma ameaça significativa para bebês e crianças. Avanços na compreensão dos mecanismos moleculares do desenvolvimento cardíaco identificaram genes-chave envolvidos no controle transcricional, sinalização e morfogênese, com alguns envolvidos no desenvolvimento de defeitos cardíacos congênitos. No entanto, o sequenciamento do genoma sozinho não pode prever ou curar a CHD. Além da genética, a epigenética desempenha um papel relevante no desenvolvimento cardíaco, com evidências crescentes sugerindo sua desregulação na patogênese da CHD⁴¹.

A etiologia dos defeitos cardíacos congênitos (CHD) é complexa e multifatorial, com 80% dos casos atribuídos à interação entre fatores genéticos e ambientais. Os fatores genéticos incluem distúrbios de gene único, distúrbios cromossômicos e distúrbios de gene duplo. A síndrome de Holt-Oram e a síndrome de Mafonte são exemplos de defeitos de gene único que podem causar fenótipos de CHD⁴². Defeitos cromossômicos, incluindo síndrome de Down e trissomia 18, são contribuintes comuns⁴³.

Defeitos de dois genes envolvem deformidades estruturais cardiovasculares⁴⁴. Fatores de risco ambientais maternos, como diabetes mellitus gestacional, deficiências alimentares, uso de drogas, idade materna, tabagismo, obesidade, doenças febris durante a gravidez, consumo de álcool e infecções virais, foram associados ao desenvolvimento de CHD na prole⁴⁵.

As modificações epigenéticas regulam a expressão genética, alterando a estrutura local da cromatina e influenciando as interações entre a cromatina e as proteínas de ligação ao DNA. Diferenças na metilação do DNA foram observadas nos corações de embriões entre E11.5 e E14.5, com correlações com a expressão genética alterada⁴⁶. Por exemplo, a regulação negativa da hialuronana sintase 2 (Has2) em E14.5 foi associada à metilação do intensificador mediada pela DNA metiltransferase 3b. Os níveis de metilação de APOA5 e PCSK9 eram elevados em neonatos com estenose da valva aórtica (EVA), indicando fatores de risco para doença cardíaca congênita em adultos⁴⁷.

Pacientes com tetralogia de Fallot (TOF) e defeitos do septo ventricular congênitos (DSV) exibiram hipermetilação na região promotora da proteína sintase oxidativa do citocromo C (SCO2)⁴⁸. Em várias doenças, incluindo câncer colorretal avançado e neoplasia intraepitelial cervical de alto grau, estudos demonstraram o valor prognóstico e preditivo da metilação do LINE-1^{49,50}. Descobriu-se que a hipermetilação materna do DNA do LINE-1 está relacionada a um risco aumentado de doença arterial coronariana (DAC) não síndrômica. Os fatores de risco maternos estão ligados à metilação atípica do DNA, que subsequentemente resulta no desenvolvimento de doença cardíaca coronária⁵¹.

O metil para metilação do DNA nas células é fornecido pelo ácido fólico, uma vitamina B. O metabolismo anormal do folato materno coloca o feto em risco de DAC se a deficiência de folato resultar em hiper-homocisteinemia. A metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima importante no metabolismo do folato⁵². A mutação MTHFR C677T está associada a até 50% de certas DCCs⁵³.

Estudos usaram a análise de enriquecimento da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), a análise da Gene Ontology (GO) e a análise da via KEGG para identificar 9625 genes diferencialmente metilados, associados às principais vias de desenvolvimento cardíaco. Entre estes, a análise GO revelou uma forte associação entre a metilação pré-natal do DNA placentário e a doença cardíaca congênita (CHD), com certos genes, como TLL1, CRABP1, FDFT1 e PCK2, localizados dentro das regiões diferencialmente metiladas, sendo associados a fenótipos clínicos⁴⁸.

As modificações de histona também surgiram como reguladores potentes da estrutura da cromatina e do controle transcricional durante o desenvolvimento do coração. Elas podem afetar a estrutura da cromatina e, na sequência, regular a disponibilidade de fatores de transcrição e complexos de iniciação, levando à ativação ou silenciamento de genes⁵⁴. Experimentos de knockout destacaram os papéis críticos de várias enzimas modificadoras de histona no desenvolvimento do coração⁵⁵. A nomenclatura para modificações de histona é relacionada ao tipo particular de histona, ao tipo e localização de aminoácido e ao tipo modulador⁵⁶.

As modificações de histona são influenciadas por fatores *writers*, como metiltransferases e acetiltransferases, fatores *erasers*, como desmetilases e desacetilases, e fatores *readers*, como proteínas efetoras que identificam locais de bandas específicos. Mudanças aberrantes nesses fatores estão ligadas ao desenvolvimento de DAC. É importante observar que os termos técnicos sejam explicados quando usados inicialmente. Um estudo identificou mutações de novo significativas em genes *writers*, *erasers* e *readers* da metilação de H3K4 durante a metilação de H3K4 ou ubiquitinação de H2BK120⁵⁷.

Essas descobertas sugerem um papel patogênico potencial da metilação anormal de histona na DAC⁵⁷. WDR5 é um componente fundamental do complexo metiltransferase de lisina humana (MLL) e metiltransferase de histona SET1 H3K4, abrangendo domínios estruturais SET. Este complexo é reconhecido como um intérprete da metilação de H3K4⁵⁸. A síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS), caracterizada por falha de crescimento e disfunção orgânica, está ligada à deleção de WHSC1, uma proteína candidata⁵⁹.

RNAs não codificantes, incluindo RNAs não codificantes longos (LncRNAs) e microRNAs (miRNAs), desempenham papéis essenciais na regulação da expressão gênica. Enquanto os miRNAs interagem principalmente com o mRNA para reprimir a tradução, os LncRNAs podem se envolver diretamente com complexos de remodelação da cromatina para regular a transcrição. Estudos identificaram expressão irregular de miRNA em pacientes com TOF, com miR-421 sendo implicado na regulação de SOX4⁶⁰.

A superexpressão de miR-424 foi associada ao aumento da proliferação e diminuição da expressão de HAS2 e NF1 em cardiomiócitos do ventrículo direito de pacientes com TOF⁶¹. Além disso, os miRNAs são promissores para preservar e corrigir a função cardíaca em pacientes com doença cardíaca estrutural, pois são importantes para a proliferação, maturação e remodelação patológica dos cardiomiócitos⁶².

Avanços têm se concentrado na utilização de biomarcadores epigenéticos para o diagnóstico de CHD⁶³. Padrões aberrantes de metilação de DNA e miRNAs circulantes estão sendo investigados como potenciais indicadores de diagnóstico. Em casos de tetralogia de Fallot (TOF), um ensaio de metilação em todo o genoma identificou 25 genes com alta precisão preditiva, incluindo aqueles associados ao desenvolvimento cardíaco⁶⁴. Uma abordagem semelhante em casos isolados de defeito do septo ventricular (DSV) revelou 80 locais CpG em 80 genes altamente precisos na previsão de DSV⁶⁵.

Os miRNAs circulantes, como hsa-let-7a e hsa-let-7b, demonstram valor diagnóstico para defeitos do septo atrial, e um painel de miRNAs séricos maternos, incluindo miR-19b, miR-22, miR-29c e miR-375, mostra-se promissor para o diagnóstico precoce de CHD fetal. Apesar dessas descobertas, a identificação de biomarcadores específicos e confiáveis não foi confirmada. Mais pesquisas são essenciais para estabelecer a utilidade clínica desses biomarcadores epigenéticos no diagnóstico de CHD^{66,67}.

3.1 Cardiomiopatia

As cardiomiopatias constituem um grupo de doenças miocárdicas caracterizadas por hipertrofia ou dilatação ventricular anormal, com etiologias complexas e variadas. Embora a base genética de todas as cardiomiopatias seja um dado adquirido, a complexidade dos fatores genéticos aumenta a dificuldade envolvida no tratamento da doença. Pesquisas revelaram que os fenótipos da cardiomiopatia são influenciados não apenas por variações genéticas dentro da sequência de codificação do DNA, mas também pelo estado funcional do próprio genoma. Consequentemente, os estudos epigenéticos têm se concentrado em elucidar mudanças na expressão gênica resultantes de mecanismos regulatórios⁶⁸.

A cardiomiopatia diabética (CD) representa uma das complicações mais graves do diabetes, sendo uma condição multifatorial e heterogênea marcada pela dilatação do ventrículo esquerdo e função miocárdica prejudicada. Devido às variações em todo o genoma na expressão genética, as alterações epigenéticas ajudam a entender a patogênese das cardiomiopatias. Mudanças dinâmicas na metilação do DNA durante o desenvolvimento cardíaco e a doença são

críticas para a diferenciação celular. Estudos revelaram que a metilação do DNA está associada à cardiomiopatia⁶⁹. O estudo de Movassagh et al⁷⁰, por exemplo, forneceu um perfil de metilação do DNA em todo o genoma de corações em estágio terminal em indivíduos normais e pacientes com cardiomiopatia. Eles também demonstraram a associação entre metilação do DNA e cardiomiopatia.

É importante ressaltar que o cálcio (Ca^{2+}) desempenha um papel importante na regulação da função cardíaca sistólica e diastólica na CD. Anormalidades na adenosina trifosfatase de cálcio do retículo sarcoendoplasmático (SERCA2a) – essencial para o Ca^{2+} -transporte durante a contratilidade cardíaca – foram identificados como um mecanismo patogênico de insuficiência cardíaca em CD. Alterações na metilação dos sítios CpG na região promotora de SERCA2a afetam o Ca^{2+} miocárdico concentração e função por meio de sua atividade. Essas descobertas indicam o potencial dos padrões de metilação do DNA como novos biomarcadores epigenéticos para o diagnóstico de CD^{71,72}.

Cardiomiopatia restritiva (MCR) é definida como uma cardiomiopatia caracterizada por disfunção diastólica restritiva ventricular, com volumes diastólico final e sistólico final ventriculares normais ou reduzidos, e exclui cardiomiopatia isquêmica, doença cardíaca valvular, doença pericárdica e doença cardíaca congênita. É causada por um gene cTnI mutado. Uma mutação cTnI foi relatada e validada em modelos animais de cardiomiopatia restritiva em uma família mutante cTnI^{73,74}.

A MCR tem um impacto sério na vida e saúde das crianças. As modificações epigenéticas mediadas por histonas desacetilases (HDACs) desempenham um papel importante no desenvolvimento e na doença cardíaca. No entanto, o papel das modificações epigenéticas na disfunção diastólica não é bem compreendido. Estudos indicaram que camundongos cTnI com knockout cardíaco específico apresentam disfunção diastólica aguda cerca de 17–18 dias após o nascimento⁷⁵.

Mecanismos epigenéticos, especificamente mudanças na acetilação da histona, foram envolvidos na expressão de cTnI e ssTnI em estudos^{74,76}. A metilação do DNA tem um impacto negativo na expressão desses genes. Uma diminuição gradual na acetilação da histona H3 na região SURE a montante da ssTnI foi observada, além das mudanças nos níveis de metilação do DNA. Isso é uma indicação do envolvimento dos níveis de acetilação da histona H3 na regulação do silenciamento da expressão da ssTnI⁷⁶.

O nível de acetilação da histona H3 na região-chave do promotor da cTnI apresentou tendências idênticas, indicando seu envolvimento no mecanismo regulador da redução da expressão da cTnI⁷⁵. Portanto, é incerto se a manipulação dos níveis de acetilação da H3 nas regiões promotoras da ssTnI e da cTnI pode ser usada para regular sua expressão. Também não está claro se o aumento da expressão de cTnI e o reinício de ssTnI podem melhorar a disfunção diastólica⁷⁴⁻⁷⁶.

Estudos têm demonstrado uma correlação significativa entre modificações de histona e o início de CD. Por exemplo, níveis de trimetilação de lisina H3 de histona nas posições IV e dimetilação de lisina H3 na posição IX geralmente exibem diminuições no tecido cardíaco de CD, em comparação com corações normais⁷⁷. Em eucariotos, existem quatro classes de genes de acetilase (HDAC) identificados. O knockout cardíaco específico de HDAC1 e HDAC2 leva à letalidade neonatal e à regulação positiva de genes relacionados a CD, incluindo aqueles que codificam proteínas contráteis específicas do músculo esquelético e vias de cálcio⁷⁸. No entanto, o papel preciso da acetilação de histona no desenvolvimento de DCM permanece incompletamente compreendido^{77,78}.

3.2 Hipertensão

Embora os mecanismos que regulam a pressão arterial tenham sido estudados durante muitos anos em humanos e em modelos animais, não foi possível identificar os genes e variantes relevantes ligando genes únicos ou polimorfismos genéticos à hipertensão⁷⁹. Estudos de associação genômica ampla (GWAS), conduzidos na Europa e nos Estados Unidos, relataram associações entre mais de 10 loci gênicos e pressão arterial, mas ainda há muitas outras variantes genéticas a serem descobertas⁸⁰.

É bem sabido que a sequência de DNA de um gene é apenas um molde e que cada célula de um organismo superior deve ligar ou desligar sua informação genética instrucional, por meio de modificações epigenéticas de todo o genoma, de modo que todo o conjunto de genes expresse uma diversidade de células e tecidos. Além de regular a expressão e a herança genética, as modificações epigenéticas desempenham um papel importante na prevenção e no tratamento de uma ampla gama de doenças crônicas, e essas regulamentações são acessíveis

e hereditárias⁸¹. No entanto, o GWAS também identificou alguns loci de suscetibilidade genética à hipertensão que têm pouco efeito na pressão arterial da população, um fenômeno conhecido como deleção genética⁸².

A epigenética fornece uma inter-relação entre o ambiente e o DNA nuclear. Por meio dos processos de glicólise e fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS), o metabolismo mitocondrial celular produz energia⁸³. Os genes bioenergéticos requerem cis e trans-regulação do DNA mitocondrial e estão presentes tanto na cromatina quanto no DNA mitocondrial⁸⁴. Quando o sistema bioenergético converte energia térmica do ambiente em abundância de ATP, há um aumento nos níveis de fosforilação e acetilação da cromatina, juntamente com a replicação e transcrição do DNA mitocondrial. Por outro lado, quando a conversão de energia é limitada, a fosforilação e a acetilação são perdidas, resultando na inibição da expressão gênica⁸⁵. A fosforilação e a acetilação desempenham um papel essencial na regulação da sinalização celular. Essa interação entre o ambiente e a epigenética contribui para o fenótipo clínico de distúrbios regulados epigeneticamente⁸³⁻⁸⁵.

Na última década, evidências mostraram que mecanismos epigenéticos, como modificações de DNA ou histona, desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica em várias doenças⁸⁶. A metilação do DNA pode induzir mudanças estruturais na cromatina, recrutando a proteína de ligação ao metil CpG (MeCP) e HDAC⁸⁷. Foi demonstrado que o MeCP2 interage com a DNA metiltransferase (DNMT). A expressão aberrante de DNMT e MeCP2 pode afetar os níveis de metilação do DNA, levando a fenótipos de doenças^{88,89}.

No entanto, o desenvolvimento e o início da hipertensão estão associados à metilação do DNA. Metilação e desmetilação de genes, como 11 β esteroide desidrogenase 2 (11 β -HSD-2), enzima conversora de endotelina 1 (ECE-1) e AT1b afetam a expressão de enzimas e receptores metabólicos⁹⁰. Isso leva ao desenvolvimento de hipertensão pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, causando retenção renal de sódio. Considera-se que a metilação do receptor de angiotensina II tipo 1b (AT1b) tenha um efeito regulador no início e desenvolvimento da hipertensão⁹¹. Assim, seu baixo nível de metilação pode ser um fator contribuinte para a hipertensão⁹¹.

Foi descoberto que as modificações de histona também estão associadas à hipertensão. Pesquisas sugerem que alterações epigenéticas em histonas podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão⁹². A acetilação de histona foi relacionada à ativação de genes e replicação de DNA⁹³. Foi relatado que a estimulação de melatonina aumenta a acetilação de histona H3. Além disso, a melatonina promove a excitabilidade central na medula ventrolateral rostral (RVLM) da medula oblonga e regula a pressão arterial elevada⁹⁴.

O RNA interferente pequeno (siRNA) se tornou uma ferramenta importante para regular a expressão genética. A interferência de RNA (RNAi) envolve o uso de RNA fita dupla (dsRNA) para degradar ou impedir a tradução de um mRNA de gene alvo, resultando no silenciamento específico da expressão do gene alvo. O silenciamento direcionado ao siRNA de p22phox (sip22phox) foi relatado como inibidor da resposta contrátil de células musculares lisas induzidas pela NADPH oxidase Ang II⁹⁵. O silenciamento de RNA também atenua os níveis de fosforilação oxidativa induzidos por Ang II e sua resposta de aumento progressivo⁹⁶.

3.3 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela deposição de lipídios, resultando em eventos cardiovasculares agudos, como infartos do miocárdio e acidente vascular cerebral⁹⁷. O desenvolvimento e a ruptura da placa aterosclerótica são os principais responsáveis por esses eventos cardiovasculares. Uma melhor compreensão das modificações epigenéticas tem o potencial de elucidar ainda mais a patogênese da aterosclerose, pois podem servir como uma ponte entre fatores ambientais e genéticos⁹⁸.

As modificações epigenéticas desempenham um papel relevante na regulação da expressão gênica e na alteração da função de proteínas e células em resposta a estímulos externos. Estudos destacaram a ligação causal entre estresse e aterosclerose, determinada por padrões epigenéticos de regulação da expressão gênica⁹⁹. Os fatores de risco para aterosclerose incluem mutações epigenéticas em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos. Portanto, um estudo abrangente dos mecanismos regulatórios epigenéticos da aterosclerose pode gerar novas estratégias terapêuticas e alvos moleculares para a prevenção e tratamento desta condição^{98,99}.

A metilação do DNA está envolvida em vários processos biológicos, incluindo a regulação da expressão gênica, impressão, embriogênese, diferenciação celular e desenvolvimento em organismos superiores. Estudos confirmaram que aberrações de metilação

do DNA em todo o genoma estão associadas ao desenvolvimento de aterosclerose. Foi proposto, no final da década de 1990, que padrões anormais de metilação do DNA promovem aterosclerose e que deficiências em folato, vitamina B6 e B12 – necessárias para a metilação – levam à hipometilação do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose¹⁰⁰.

No início do desenvolvimento da aterosclerose, a parede arterial exibe hipometilação em todo o genoma e hipermetilação de promotores de genes específicos¹⁰¹. A hipometilação é conhecida por promover a proliferação de células musculares lisas vasculares¹⁰². Estudos mostraram que camundongos com uma deleção genética da metilenotetra-hidrofolato (MTHFR -/-) redutase e hiper-homocisteinemia exibem deposição de lipídios aórticos¹⁰³.

Foi descoberto que a exposição prolongada de células endoteliais da veia umbilical humana à lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL) leva ao aumento da metilação do DNA mediada pelo receptor-1 da lipoproteína de baixa densidade oxidada semelhante a hemaglutinina (LOX-1), aumentando os efeitos antiapoptóticos em sua prole¹⁰⁴. Portanto, um estudo aprofundado da metilação do DNA e seu significado biológico no desenvolvimento da aterosclerose fornecerá uma compreensão mais precisa da influência da metilação do DNA na ocorrência e progressão da aterosclerose^{103,104}.

As histonas sofrem várias modificações covalentes, incluindo acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, glicosilação e carbonilação, que coletivamente constituem o código da histona. A pesquisa em modificação de histona tem se concentrado principalmente na acetilação de histona. Como um processo patológico caracterizado por inflamação crônica, o fator nuclear-kappa B (NF-κB) desempenha um papel fundamental na regulação dos genes envolvidos na inflamação. A ligação de IL-1β, TNF-α, NF-κB e CBP desencadeiam a acetilação da histona, resultando na regulação positiva da expressão gênica inflamatória mediada por NF-κB e facilitando o recrutamento e ativação de células inflamatórias em placas¹⁰⁵.

A remodelação vascular mediada por células musculares lisas vasculares, um aspecto crítico do início e progressão da aterosclerose, também é regulada por modificações de acetilação de histona. As células endoteliais dentro de placas ateroscleróticas exibem expressão e atividade de HDAC-2 diminuídas. Além disso, a inibição de HDAC demonstrou exacerbar lesões de aterosclerose em *Ldlr*^{-/-} de ratos¹⁰⁵. HDAC-3 aumenta a atividade de Akt para sustentar a integridade endotelial, e sua regulação negativa leva a lesões graves de aterosclerose em *ApoE*^{-/-} de camundongos¹⁰⁶. A remodelação vascular mediada por células musculares lisas, essencial na progressão da aterosclerose, também é regulada por modificações de acetilação de histonas¹⁰⁷.

Foi descoberto que a inibição de HDAC-1, 2 e 3 dificulta a proliferação de células musculares lisas¹⁰⁸. Além disso, os inibidores de HDAC bloqueiam a fosforilação de Rb induzida por CDK/ciclina, resultando na redução da expressão de genes alvo a jusante do fator de transcrição E2F, que controla o ponto de verificação G1-S e a proliferação celular¹⁰⁹. Foi demonstrado que os inibidores de HDAC promovem a proliferação de células musculares lisas vasculares, induzidas por PDGF, em camundongos, inibindo a tioredoxina-1 e ativando a via de sinalização dependente de Akt¹¹⁰. O impacto diverso dos inibidores de HDAC e siRNAs nas reações inflamatórias e na multiplicação de células musculares lisas surge potencialmente de diferenças estruturais nos inibidores e na variedade de espécies de HDAC. Mais investigações são necessárias para elucidar seus mecanismos¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

Os microRNAs (miRNAs) são expressos no sistema cardiovascular e estão relacionados a DCVs. Vários miRNAs, que são expressos em células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas, foram descobertos como participantes da patogênese da aterosclerose. Por exemplo, a superexpressão de miR-33 em macrófagos demonstrou reduzir o efluxo de colesterol para ApoA1, enquanto a regulação positiva da expressão da proteína ABCA1 aumenta o efluxo de colesterol para ApoA¹¹¹. Em modelos murinos, *ApoE*^{-/-}-miR-33^{-/-} em camundongos apresentaram início de aterosclerose, dificultado pelo aumento dos níveis de HDLC e do efluxo de colesterol dos macrófagos via ABCA1 e ABCG1 em comparação com *ApoE*^{-/-}-miR-33^{+/+} em camundongos¹¹².

Outro estudo demonstrou que o miR-126 reprime a expressão de VCAM-1, inibindo a adesão de leucócitos às células endoteliais. Isso sugere que o miR-126 pode regular a inflamação vascular, controlando a expressão de moléculas de adesão¹¹³. Além disso, o miR-126 suprime a expressão de CXCL-12, reduzindo o número de macrófagos e células apoptóticas dentro das placas, promovendo a redução da área da lesão e da gravidade da inflamação¹¹⁴.

À medida que a pesquisa sobre miRNAs na aterosclerose se aprofunda, miRNAs adicionais que regulam o desenvolvimento da aterosclerose serão identificados e seus mecanismos esclarecidos, oferecendo novos alvos e abordagens para a prevenção e tratamento

da aterosclerose. Embora estudos clínicos indiquem que os inibidores de HDAC são bem tolerados, análises adicionais de mecanismos regulatórios epigenéticos no desenvolvimento da aterosclerose e o desenvolvimento de medicamentos cardiovasculares, com especificidade e efeitos colaterais limitados, continuam sendo as áreas essenciais que justificam foco das pesquisas no futuro¹⁰⁸⁻¹¹⁴.

REFERÊNCIAS

1. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006;1(2):76–80.
2. Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet*. 1994;15(5):453–7.
3. Riggs AD, Porter TN. Overview of epigenetic mechanisms. In: Russo VEA, Martienssen R, Riggs AD, editors. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996. p. 29–45.
4. Riggs AD, Porter TN. Introduction. In: Russo VEA, Martienssen R, Riggs AD, editors. *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996. p. 1–4.
5. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 2007;447(7143):396–8.
6. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. 2019;571(7766):489–99.
7. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 1999;236(1):87–95.
8. Mortusewicz O, Leonhardt H, Cardoso MC. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(25):8905–9.
9. Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Vire E, De Smet C, et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J*. 2005;24(2):336–46.
10. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(21):4886–92.
11. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998;18(11):6538–47.
12. Achour M, Jacq X, Rondelet G, Alhosin M, Charlot C, Chataigneau T, et al. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression. *Oncogene*. 2008;27(16):2187–97.
13. Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*. 2006;26(1):169–81.
14. Millán-Zambrano G, Burton A, Bannister AJ, Schneider R. Histone post-translational modifications—cause and consequence of genome function. *Nat Rev Genet*. 2022.
15. Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21931–6.
16. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 2001;410(6824):120–4.

17. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000;406(6796):593–9.
18. Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996;87(5):953–9.
19. Saba NF, Vadlamudi A, Liu Y, Sutlief E, Tang X, Chen Z, et al. Acetylated tubulin (AT) as a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Pathol*. 2014;8(1):66–72.
20. McLendon PM, Ferguson BS, Osinska H, Bhuiyan MS, James J, McKinsey TA, et al. Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(46):E5178–86.
21. Chan HM, La Thangue NB. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 13):2363–73.
22. Kee HJ, Kim JR, Nam YS, Park HY, Shin S, Kim JY, et al. Trichostatin A prevents neointimal hyperplasia via activation of Krüppel-like factor 4. *Vasc Pharmacol*. 2011;55(3–4):127–34.
23. Yoon S, Kim M, Lee H, Kang G, Ahn H, Kim J, et al. PP2A negatively regulates the hypertrophic response by dephosphorylating HDAC2 S394 in the heart. *Exp Mol Med*. 2018;50(12):1–14.
24. Poddar S, Kesharwani D, Datta M. Interplay between the miRNome and the epigenetic machinery: implications in health and disease. *J Cell Physiol*. 2017;232(12):2938–45.
25. Reddy S, Zhao M, Hu DQ, Fajardo G, Hu S, Ghosh Z, et al. miR-21 is associated with fibrosis and right ventricular failure. *JCI Insight*. 2017;2(7):e91625.
26. Petrovic N, Ergun S. miRNAs as potential treatment targets and treatment options in cancer. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(2):157–68.
27. St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P. The landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet*. 2015;31(5):239–51.
28. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*. 2016;17(1):47–62.
29. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncol Rep*. 2017;37(1):3–9.
30. Lou Z, Zhou C, Zhang X, Zhu C, He Y, Li J. Minor and major circRNAs in virus and host genomes. *J Microbiol*. 2021;59(4):324–31.
31. Yang T, Li Z, Jiang L, Wei Y, Li X, Han D, et al. Circle the cardiac remodeling with circRNAs. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:702586.
32. Bahn JH, Zhang Q, Li F, Chan TM, Lin X, Kim Y, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*. 2015;61(1):221–30.
33. Hansen TB, Kjems J, Damgaard CK. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Res*. 2013;73(18):5609–12.
34. Li J, Yang J, Zhou P, Le Y, Zhou C, Wang S, et al. Circular RNAs in cancer: novel insights into origins, properties, functions and implications. *Am J Cancer Res*. 2015;5(2):472–80.
35. Zhou Z, Sun B, Huang S, Zhao L. Roles of circular RNAs in immune regulation and autoimmune diseases. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):503.

36. Dogan MV, Knight S, Dogan TK, Knowlton KU, Philibert R. External validation of integrated genetic-epigenetic biomarkers for predicting incident coronary heart disease. *Epigenomics*. 2021; 13: 1095–1112.
37. Radhakrishna U, Albayrak S, Alpay-Savasan Z, Zeb A, Turkoglu O, Sobolewski P, et al. Genome-Wide DNA Methylation Analysis and Epigenetic Variations Associated with Congenital Aortic Valve Stenosis (AVS). *PLoS ONE*. 2016; 11: e0154010.
38. Chen S, Jin Q, Hou S, Li M, Zhang Y, Guan L, et al. Identification of recurrent variants implicated in disease in bicuspid aortic valve patients through whole-exome sequencing. *Human Genomics*. 2022; 16: 36.
39. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, et al. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature*. 2013; 498: 220–223.
40. Li J, Su T, Zou C, Luo W, Shi G, Chen L, et al. Long noncoding RNA H19 regulates porcine satellite cell differentiation through miR-140-5p/SOX4 and DBN1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 518724.
41. Lüscher TF. Frontiers in congenital heart disease: pulmonary hypertension, heart failure, and arrhythmias. *European Heart Journal*. 2016; 37: 1407–1409.
42. van Ouwerkerk AF, Bosada FM, van Duijvenboden K, Houweling AC, Scholman KT, Wakker V, et al. Patient-specific TBX5-G125R variant induces profound transcriptional deregulation and atrial dysfunction. *Circulation*. 2022; 145: 606– 619.
43. Boss RD, Holmes KW, Althaus J, Rushton CH, McNee H, Mc- Nee T. Trisomy 18 and complex congenital heart disease: seek-ing the threshold benefit. *Pediatrics*. 2013; 132: 161–165.
44. Mozumdar N, Rowland J, Pan S, Rajagopal H, Geiger MK, Srivastava S, et al. Diagnostic Accuracy of Fetal Echocardiography in Congenital Heart Disease. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2020; 33: 1384–1390.
45. van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, Meijboom FJ, Bouma BJ, Mulder BJM. The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nature Reviews. Cardiology*. 2011; 8: 50– 60.
46. Takizawa T, Nakashima K, Namihiro M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, *et al.* DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Developmental Cell*. 2001; 1: 749–758.
47. Chamberlain AA, Lin M, Lister RL, Maslov AA, Wang Y, Suzuki M, *et al.* DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *Journal of the American Heart Association*. 2014; 3: e000976.
48. Grunert M, Dorn C, Cui H, Dunkel I, Schulz K, Schoenhals S, et al. Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases. *Cardiovascular Research*. 2016; 112: 464–477.
49. Kaneko M, Kotake M, Bando H, Yamada T, Takemura H, Minamoto T. Prognostic and predictive significance of long interspersed nucleotide element-1 methylation in advanced-stage colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16: 945.
50. Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Canto C, La Rosa N, Cantarella MA, et al. LINE-1 hypermethylation in white blood cell DNA is associated with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *BMC Cancer*. 2017; 17: 601.
51. Chowdhury S, Cleves MA, MacLeod SL, James SJ, Zhao W, Hobbs CA. Maternal DNA hypomethylation and congenital heart defects. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*. 2011; 91: 69–76.

52. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99: 5606–5611.
53. Ghaffar AAAA, Hamza MT, Ahmad AM. Factor V Leiden (FVL), Prothrombin G20210A and MTHFR C677T mutations among patients of Budd-Chiari Syndrome. *QJM*. 2023; 116: hcad069-178.
54. Chen S, Jin Q, Hou S, Li M, Zhang Y, Guan L, et al. Identification of recurrent variants implicated in disease in bicuspid aortic valve patients through whole-exome sequencing. *Human Genomics*. 2022; 16: 36.
55. Ow JR, Palanichamy Kala M, Rao VK, Choi MH, Bharathy N, Taneja R. G9a inhibits MEF2C activity to control sarcomere assembly. *Scientific Reports*. 2016; 6: 34163.
56. Halsall JA, Andrews S, Krueger F, Rutledge CE, Ficiz G, Reik W, *et al*. Histone modifications form a cell-type-specific chromosomal bar code that persists through the cell cycle. *Scientific Reports*. 2021; 11: 3009.
57. Zaidi S, Choi M, Wakimoto H, Ma L, Jiang J, Overton JD, *et al*. De novo mutations in histone-modifying genes in congenital heart disease. *Nature*. 2013; 498: 220–223.
58. Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, *et al*. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*. 2005; 121: 859–872.
59. Hajdu I, Ciccio A, Lewis SM, Elledge SJ. Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 is involved in the cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 13130–13134.
60. Li J, Su T, Zou C, Luo W, Shi G, Chen L, *et al*. Long noncoding RNA H19 regulates porcine satellite cell differentiation through miR-140-5p/SOX4 and DBN1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 518724.
61. Zhang J, Chang JJ, Xu F, Ma XJ, Wu Y, Li WC, *et al*. MicroRNA deregulation in right ventricular outflow tract myocardium in nonsyndromic tetralogy of fallot. *The Canadian Journal of Cardiology*. 2013; 29: 1695–1703.
62. Poller W, Dimmeler S, Heymans S, Zeller T, Haas J, Karakas M, *et al*. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *European Heart Journal*. 2018;39: 2704–2716.
63. Wang G, Wang B, Yang P. Epigenetics in congenital heart disease. *Journal of the American Heart Association*. 2022; 11:e025163.
64. Radhakrishna U, Vishweswaraiah S, Veerappa AM, Zafra R, Albayrak S, Sitharam PH, et al. Newborn blood DNA epigenetic variations and signaling pathway genes associated with Tetralogy of Fallot (TOF). *PLoS ONE*. 2018; 13: e0203893.
65. Radhakrishna U, Albayrak S, Zafra R, Baraa A, Vishweswaraiah S, Veerappa AM, et al. Placental epigenetics for evaluation of fetal congenital heart defects: Ventricular Septal Defect (VSD). *PLoS ONE*. 2019; 14: e0200229.
66. Song Y, Higgins H, Guo J, Harrison K, Schultz EN, Hales BJ, et al. Clinical significance of circulating microRNAs as markers in detecting and predicting congenital heart defects in children. *Journal of Translational Medicine*. 2018; 16: 42.

67. Sun Y, Wang Q, Zhang Y, Geng M, Wei Y, Liu Y, et al. Multigenerational maternal obesity increases the incidence of HCC in offspring via miR-27a-3p. *Journal of Hepatology*. 2020; 73: 603–615.
68. Morival JLP, Widyastuti HP, Nguyen CHH, Zaragoza MV, Downing TL. DNA methylation analysis reveals epimutation hotspots in patients with dilated cardiomyopathy-associated laminopathies. *Clinical Epigenetics*. 2021; 13: 139.
69. Pepin ME, Ha CM, Crossman DK, Litovsky SH, Varambally S, Barchue JP, et al. Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure. *Laboratory Investigation*. 2019; 99: 371–386.
70. Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, Cordeddu L, Haider S, Down T, et al. Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation*. 2011; 124: 2411–2422.
71. Makarewich CA, Munir AZ, Schiattarella GG, Bezprozvannaya S, Raguimova ON, Cho EE, et al. The DWORF micropeptide enhances contractility and prevents heart failure in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *eLife*. 2018; 7: e38319.
72. Gorski PA, Jang SP, Jeong D, Lee A, Lee P, Oh JG, et al. Role of SIRT1 in modulating acetylation of the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in heart failure. *Circulation Research*. 2019; 124: e63–e80.
73. van den Wijngaard A, Volders P, Van Tintelen JP, Jongbloed JDH, van den Berg MP, Lekanke Deprez RH, et al. Recurrent and founder mutations in the Netherlands: cardiac Troponin I (TNNI3) gene mutations as a cause of severe forms of hypertrophic and restrictive cardiomyopathy. *Netherlands Heart Journal*. 2011; 19: 344–351.
74. Zhao W, Wu X, Wang Z, Pan B, Liu L, Liu L, et al. Epigenetic regulation of phosphodiesterase 4d in restrictive cardiomyopathy mice with cTnI mutations. *Science China. Life Sciences*. 2020; 63: 563–570.
75. Pan B, Quan J, Liu L, Xu Z, Zhu J, Huang X, et al. Epigallocatechin gallate reverses cTnI-low expression-induced age-related heart diastolic dysfunction through histone acetylation modification. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017; 21:2481–2490.
76. Zhao W, Liu L, Pan B, Xu Y, Zhu J, Nan C, et al. Epigenetic regulation of cardiac myofibril gene expression during heart development. *Cardiovascular Toxicology*. 2015; 15: 203–209.
77. Padeken J, Methot SP, Gasser SM. Establishment of H3K9-methylated heterochromatin and its functions in tissue differentiation and maintenance. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2022; 23: 623–640.
78. Yun F, Cheng C, Ullah S, Yuan Q. Design, synthesis and biological evaluation of novel histone deacetylase1/2 (HDAC1/2) and cyclin-dependent Kinase2 (CDK2) dual inhibitors against malignant cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020; 198: 112322.
79. Wei W, Wang X, Zhou Y, Shang X, Yu H. The genetic risk factors for pregnancy-induced hypertension: Evidence from genetic polymorphisms. *FASEB Journal*. 2022; 36: e22413.
80. Ratnapriya R, Sosina OA, Starostik MR, Kwicklis M, Kapphahn RJ, Fritsche LG, et al. Retinal transcriptome and eQTL analyses identify genes associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics*. 2019; 51: 606–610.
81. Surace AEA, Hedrich CM. The Role of Epigenetics in Autoimmune/ Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 1525.
82. Galardini M, Busby BP, Vieitez C, Dunham AS, Typas A, Beltrao P. The impact of the genetic background on gene deletion phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Systems Biology*. 2019; 15: e8831.

83. Fu Z, Kern TS, Hellström A, Smith LEH. Fatty acid oxidation and photoreceptor metabolic needs. *Journal of Lipid Research*. 2021; 62: 100035.
84. Lareau CA, Liu V, Muus C, Praktijn SD, Nitsch L, Kautz P, et al. Mitochondrial single-cell ATAC-seq for high-throughput multi-omic detection of mitochondrial genotypes and chromatin accessibility. *Nature Protocols*. 2023; 18: 1416–1440.
85. Picca A, Mankowski RT, Burman JL, Donisi L, Kim JS, Marzetti E, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. *Nature Reviews. Cardiology*. 2018; 15: 543–554.
86. Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, et al. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*. 2013; 7: 175–200.
87. Hervouet E. The Promising Role of New Generation HDACis in Anti-Cancer Therapies. *eBioMedicine*. 2018; 32: 6–7.
88. Ficiz G. New insights into mechanisms that regulate DNA methylation patterning. *The Journal of Experimental Biology*. 2015; 218: 14–20.
89. Willman EA, Collins WP. Proceedings: Studies on the source of prostaglandins E2 and F2 alpha during pregnancy in women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1975; 82: 843.
90. Zhu P, Wang W, Zuo R, Sun K. Mechanisms for establishment of the placental glucocorticoid barrier, a guard for life. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76: 13–26.
91. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJL. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circulation Research*. 2007; 100: 520–526.
92. Chelladurai P, Boucherat O, Stenmark K, Kracht M, Seeger W, Bauer UM, et al. Targeting histone acetylation in pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *British Journal of Pharmacology*. 2021; 178: 54–71.
93. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2014; 15: 703–708.
94. Sharma R, Ottenhof T, Rzeczowska PA, Niles LP. Epigenetic targets for melatonin: induction of histone H3 hyperacetylation and gene expression in C17.2 neural stem cells. *Journal of Pineal Research*. 2008; 45: 277–284.
95. Modlinger P, Chabrashvili T, Gill PS, Mendonca M, Harrison DG, Griendling KK, et al. RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slow pressor response. *Hypertension*. 2006; 47: 238–244.
96. Desai AS, Webb DJ, Taubel J, Casey S, Cheng Y, Robbie GJ, et al. Zilebesiran, an RNA interference therapeutic agent for hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2023; 389:228–238.
97. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 2008; 451: 904–913.
98. Milagro FI, Mansego ML, De Miguel C, Martínez JA. Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013; 34: 782–812.
99. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*. 2012; 111: 245–259.

100. Abdul-Salam VB, Russomanno G, Chien-Nien C, Mahomed AS, Yates LA, Wilkins MR, *et al.* CLIC4/Arf6 Pathway. *Circulation Research*. 2019; 124: 52–65.
101. Hoshimoto S, Takeuchi H, Ono S, Sim MS, Huynh JL, Huang SK, *et al.* Genome-wide hypomethylation and specific tumorrelated gene hypermethylation are associated with esophageal squamous cell carcinoma outcome. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2015; 10: 509–517.
102. Hiltunen MO, Ylä-Herttuala S. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003; 23: 1750–1753.
103. Devlin AM, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Rozen R, Lentz SR. Effect of Mthfr genotype on diet-induced hyperhomocysteinemia and vascular function in mice. *Blood*. 2004; 103:2624–2629.
104. Liu C, Xu D, Han H, Fan Y, Schain F, Xu Z, *et al.* Transcriptional regulation of 15-lipoxygenase expression by histone h3 lysine 4 methylation/demethylation. *PLoS ONE*. 2012; 7: e52703.
105. Bedenbender K, Beinborn I, Vollmeister E, Schmeck B. p38 and casein kinase 2 mediate ribonuclease 1 repression in inflamed human endothelial cells via promoter remodeling through nucleosome remodeling and deacetylase complex. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 563604.
106. Lee DY, Lee CI, Lin TE, Lim SH, Zhou J, Tseng YC, *et al.* Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 1967–1972.
107. Jung SB, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Mattagajasingh I, Hoffman TA, *et al.* Histone deacetylase 3 antagonizes aspirin-stimulated endothelial nitric oxide production by reversing aspirin-induced lysine acetylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Research*. 2010; 107: 877–887.
108. Zhou B, Margariti A, Zeng L, Habi O, Xiao Q, Martin D, *et al.* Splicing of histone deacetylase 7 modulates smooth muscle cell proliferation and neointima formation through nuclear β -catenin translocation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011; 31: 2676–2684.
109. Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, Postigo AA, Ma D, Luo RX, *et al.* Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell*. 2000; 101: 79–89.
110. You BR, Park WH. Suberoylanilide hydroxamic acid-induced HeLa cell death is closely correlated with oxidative stress and thioredoxin 1 levels. *International Journal of Oncology*. 2014;44: 1745–1755.
111. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, *et al.* MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. 2010; 328: 1570–1573
112. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, *et al.* MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *Journal of the American Heart Association*. 2012; 1: e003376.
113. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105: 1516– 1521.
114. Suresh Babu S, Thandavarayan RA, Joladarashi D, Jeyabal P, Krishnamurthy S, Bhimaraj A, *et al.* MicroRNA-126 overexpression rescues diabetes-induced impairment in efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes. *Scientific Reports*. 2016; 6: 36207.