

POTENCIAIS TERAPÊUTICOS DO RNA EM CARDIOLOGIA: UMA NOVA FRONTEIRA NO MANEJO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Gabriel Mendes Horevicht Laporte Mascarenhas;
André de Caires Milet;
Diego Viana Sepulveda;
João Victor Scardini Moreira;
Lilian Cavalheiro de Almeida;
Natália Raissa Dias de Oliveira;
Rosecleide Meneses dos Santos Vitorini;
Wesley de Farias Silva;
Angela Cristina Ramos Guimarães de Faria;
Murilo Mallon

Resumo As doenças cardiovasculares (DCVs) continuam sendo a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, motivando a busca por terapias mais eficazes e personalizadas. Nos últimos anos, as terapias baseadas em RNA têm emergido como uma estratégia promissora para o tratamento de diversas condições cardiovasculares. Essas abordagens envolvem o uso de diferentes tipos de RNA, como RNA mensageiro (mRNA), RNA de interferência (RNAi), microRNA (miRNA) e oligonucleotídeos antisense, para modular a expressão gênica de maneira precisa. O avanço da biotecnologia e o desenvolvimento de sistemas de entrega mais seguros e eficientes permitiram a aplicação clínica de algumas dessas terapias, com resultados iniciais encorajadores. Entre os alvos terapêuticos estudados estão genes relacionados à dislipidemia, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e aterosclerose. Um exemplo notável é o uso de RNAi para inibir a expressão da proteína PCSK9, envolvida na regulação dos níveis de colesterol LDL, demonstrando eficácia na redução de eventos cardiovasculares. Além disso, terapias com miRNA têm mostrado potencial para regular processos inflamatórios, remodelamento cardíaco e angiogênese, fundamentais na fisiopatologia das DCVs. Apesar do progresso, desafios como a imunogenicidade, a estabilidade das moléculas de RNA e a especificidade da entrega ainda limitam a aplicação generalizada dessas terapias. Ensaios clínicos em andamento buscam validar a segurança e a eficácia dessas abordagens em populações maiores e em diferentes contextos clínicos. A perspectiva futura inclui o desenvolvimento de terapias combinadas, uso de RNA em edição gênica e estratégias personalizadas com base no perfil genético dos pacientes. Em resumo, as terapias com RNA representam uma fronteira inovadora na cardiologia, com o potencial de transformar a abordagem terapêutica das DCVs. A compreensão aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos e a superação dos desafios técnicos são fundamentais para a consolidação dessas terapias como parte do arsenal clínico na prática médica cardiovascular.

Palavras-chave: Terapia com RNA. Doenças cardiovasculares. Interferência por RNA. RNA mensageiro. Terapia genética.

1. TERAPIA GENÉTICA

A terapia genética corresponde a entrega de material genético em células ou tecidos para tratar doenças. Os genes introduzidos podem conferir novas funções, melhorar as existentes ou substituir variantes defeituosas por funcionais. Esse processo pode resultar em mudanças permanentes pela integração do DNA no genoma da célula ou alterações temporárias pela manutenção do DNA, em um estado episomal ou expressão de mRNA. Os estágios iniciais do desenvolvimento da terapia genética enfrentaram desafios, devido a uma compreensão limitada das doenças, dificultando o progresso no campo. Os avanços no conhecimento sobre as doenças são, portanto, essenciais cruciais para a melhoria contínua e o sucesso das abordagens da terapia genética¹.

Nos últimos anos, por exemplo, o RNA surgiu como uma via terapêutica promissora para várias doenças humanas, incluindo as doenças cardiovasculares (DCV)^{2,3}. Os papéis funcionais dos RNAs não codificantes, abrangendo RNAs não codificantes longos (lncRNAs), microRNAs (miRNAs) e RNAs circulares (circRNAs), vieram à tona, contribuindo para a compreensão de suas implicações nos processos de doenças³. Um espectro de moléculas de RNA sintetizadas sinteticamente, variando de RNA interferente pequeno (siRNA), RNA de

grampo curto (shRNA), oligonucleotídeos antisense (ASOs), RNA ativador curto (saRNA) e aptâmeros de RNA a RNA de guia único (sgRNA) para sistemas CRISPR/Cas9, foi utilizado em estudos clínicos⁴.

Os resultados potenciais das vacinas baseadas em RNA mensageiro (mRNA) contra a COVID-19 registraram o pioneirismo da terapêutica de RNA^{5,6}. As vantagens distintas das terapias baseadas em RNA, incluindo a facilidade de controle da dosagem, a baixa imunogenicidade e a ausência de riscos de integração genômica, causaram um grande interesse, posicionando os produtos baseados em ácido nucleico como uma abordagem terapêutica promissora⁷.

2. O RNA

Segundo Crick⁸, o conceito central da biologia molecular considera que o DNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA), sendo então traduzido em proteínas. A fidelidade molecular é mantida entre DNA e RNA e entre adaptadores de RNA e tRNA por meio do pareamento de bases complementares de Watson-Crick. Até a conclusão do Projeto Genoma Humano, em 2003, acreditava-se que essa era a única função do genoma – ser transcrito em RNA mensageiro e codificado para proteínas. No entanto, o relato final de apenas cerca de 21.000 genes codificadores de proteínas, representando apenas 1% do genoma humano, trouxe à tona a questão de por que a esmagadora maioria do genoma, então chamado de DNA lixo, havia sido conservada por meio da evolução a um custo biologicamente energético alto⁹.

A revolução no sequenciamento genômico profundo e de RNA de última geração revelou que a porção do genoma humano usada para codificar proteínas é superada pela proporção que é transcrita em RNAs não codificantes (ncRNAs). Os ncRNAs não têm capacidade de codificação de proteínas, mas permanecem como moléculas de RNA funcionais de várias subclasses. Eles representam uma família extensa e heterogênea de moléculas de RNA biologicamente funcionais, que desempenham papéis essenciais na diferenciação, desenvolvimento, homeostase e doença⁹.

Importante notar que vários lncRNAs foram encontrados para codificar peptídeos “micro” crípticos, curtos e funcionalmente relevantes. Um exemplo no campo cardiovascular, foi a descrição de uma série de micropeptídeos que agem de forma semelhante ou contrária ao fosfolambam (PLB), em sua capacidade de modular o fluxo de cálcio medicamentoso SERCA2^{10,11}. Assim, os ncRNAs considerados como tal são apenas não codificantes¹². A revelação do ncRNA levou a uma reavaliação do conceito da biologia molecular. A categorização do ncRNA tem sido despadronizada, em parte por causa da taxa explosiva de descoberta de ncRNAs, com diferentes estruturas, funções e contextos genômicos por diferentes laboratórios, instituições e campos¹³.

2.1 RNAs mensageiros

Os mRNAs são os RNAs fita simples, codificadores de proteínas clássicos, transcritos de genes codificadores de proteínas de forma complementar, por meio de pares de bases pela RNA polimerase II. Ele passa por uma série de modificações pós-transcricionais antes da tradução, incluindo 5' capping, 3' poliadenilação e splicing de íntrons não codificadores para formar um mRNA maduro. Diferentes isoformas de uma proteína podem ser formadas a partir do mesmo gene e pelo processo regulado de splicing alternativo. A estabilidade, a localização e a função dos mRNAs podem ser alteradas ainda mais por modificações pós-transcricionais, como a N6-metilização da adenosina ou pela edição de RNA (A para I) com a adenosina sendo substituída por inosina¹⁴.

2.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de fita simples, de 21-23 nt, que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente por pareamento de bases complementares a mRNAs ou outros alvos de ncRNA, prevenindo a tradução, atividade e/ou preparando-os para degradação. Os maduros são processados a partir de pri-miRNAs e pré-miRNAs, por meio de mecanismos dependentes de Drosha/DICER^{15,16}.

Além disso, eles são conhecidos por serem reguladores-chave do desenvolvimento cardiovascular, homeostase e doenças, com estudos funcionais *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demonstrando que a modulação de sua atividade afeta a bioquímica celular e a função cardiovascular, se apresentando como alvos terapêuticos para prevenir ou tratar o declínio da DCV^{17,18}. Em comparação com os RNAs ASO e antisense, as terapêuticas baseadas em miRNAs continuam sendo um desafio, devido, pelo menos em parte, à falta de compreensão de seus

mecanismos de ação. Sua eficácia terapêutica inclui especificidade/afinidade de ligação, efeitos fora do alvo, o número de sítios de ligação do miRNA por mRNA alvo e capacidade de se ligar ao complexo AGO/GW182¹⁹.

2.3 ncRNAs longos

Os ncRNAs com mais de 200 pares de bases de comprimento são descritos como lncRNAs. Porém, os lncRNAs continuam a ser divididos em categorias, de acordo com seu contexto ou função genômica, como, por exemplo²⁰:

- lncRNAs intergênicos ou intervenientes estão localizados entre genes anotados;
- lncRNAs intragênicos podem ser encontrados dentro de genes descritos, como dentro de íntrons;
- lncRNAs antisense são codificados na fita de DNA genômico oposta aos genes codificadores de proteínas (RNAs antisense); e
- lncRNAs codificados por intensificadores ou promotores são conhecidos como lncRNAs intensificadores.

Não diferente das proteínas, os lncRNAs podem formar estruturas de ordem superior e motivos estruturais definidos que regulam e determinam sua função. A cristalografia de raios X pode ser usada para determinar a estrutura do lncRNA, isoladamente ou em complexo com parceiros de proteína ligados. Programas in silico também estão sendo desenvolvidos para prever estruturas complexas de lncRNA e potenciais parceiros de interação²⁰.

As previsões do número de lncRNAs codificados pelo genoma humano correspondem a dezenas de milhares, mas apenas centenas foram funcionalmente validados e caracterizados, representando menos de 1% de todos os lncRNAs. Além disso, há uma falta de documentação de anotados e funcionalmente validados em um banco de dados centralizado. Vários projetos de larga escala se concentram em anotar lncRNAs, incluindo FANTOM, NONCODE, GENCODE e Refseq²¹. Existem outros bancos de dados menores que documentam, por exemplo, a função do lncRNA ou lncRNAs com papéis na doença^{22,23}.

Em estrutura e contexto genômicos, os lncRNAs se assemelham aos mRNAs. Eles são transcritos pela RNA polimerase II, têm regiões promotoras e intensificadoras, têm sequências que se assemelham a 5' e 3' UTRs, têm íntrons e exons, e muitos são poliadenilados. Vários têm sítios de ligação de microRNA e podem sofrer modificações de RNA, como N 6-metiladenosina. Por meio dessas propriedades, os lncRNAs são passíveis de modulação por diferentes tecnologias e modalidades de RNA, assim como os mRNAs³³.

2.4 RNAs circulares

Avanços em tecnologias de sequenciamento de próxima geração permitiram a detecção de RNAs circularizados, com back-splice de 5' de regiões exônicas, e intrônicas, de até 20% de genes codificadores de proteínas e lncRNAs semelhantes, conhecidos como RNAs circulares (circRNA)²⁴. Os circRNAs foram descritos como pelo menos 2,5x mais estáveis do que os ncRNA lineares e também são encontrados na circulação²⁵. A funcionalidade conhecida dos circRNAs inclui atuar como esponjas de microRNAs e proteínas, andaimes para proteínas de ligação de RNA (RBPs) e regulação da tradução. Sua estabilidade e propriedades funcionais tornam os circRNAs não apenas um alvo, mas também potenciais agentes terapêuticos²⁶.

O primeiro panorama completo de circRNAs expressos no coração de mamíferos foi descrito em 2017, por Tan et al²⁷, onde mais de 15.000 circRNAs foram detectados no coração humano. Vários foram descritos como funcionalmente importantes ou como biomarcadores circulantes promissores de DCV. O potencial terapêutico do RNA como medicamentos e alvos de doenças é agora destaque na pesquisa básica e translacional, com pesquisa de descoberta básica, identificando novos genes e RNAs, potencialmente condutores de patologias ou protetores, e a pesquisa translacional, avaliando e otimizando sua capacidade de entrega e contenção de doenças²⁸.

3. TERAPIA GENÉTICA E VETORES VIRAIS

Os vírus, frequentemente associados à patogenicidade, possuem uma capacidade de se infiltrar eficientemente nas células hospedeiras, explorando a maquinaria de expressão genética do hospedeiro para replicação²⁹. Essa capacidade forma a base para o design de vetores virais, alavancando seu potencial para entregar e expressar genes terapêuticos em células-alvo – uma vantagem que os distingue de vetores não virais, conhecidos por sua menor eficiência de transferência genética. Por meio da substituição de todo ou de uma parte importante

do genoma viral pelo cassete de expressão escolhido, os vetores virais podem ser projetados para serem não patogênicos. Eles são categorizados em tipos integradores e não integradores³⁰.

No campo da terapia genética para DCV, três vetores virais devem ser conhecidos: vetores lentivirais, adenovirais e vírus adeno-associados (AAV). Enquanto os vetores lentivirais e AAV têm o potencial de integração no genoma do hospedeiro, o DNA do vetor adenoviral permanece episomal^{31,32}. O uso inicial de vetores lentivirais e adenovirais abriu caminho, mas os AAVs conquistaram interesse nos últimos anos, principalmente devido às suas vantagens de segurança, marcando uma evolução no cenário de vetores virais para terapia genética cardiovascular³².

3.1 Vírus Adeno-Associado (AAV)

O AAV, descoberto há mais de 40 anos como um contaminante em uma preparação de adenovírus símio, surgiu como um vírus não patogênico, incapaz de replicação autônoma. Com um diâmetro de aproximadamente 25 nm, os AAVs carregam um genoma de DNA fita simples e pertencem à família Parvoviridae e ao gênero Dependovirus, abrangendo pelo menos 13 sorotipos naturais e mais de 100 variantes. Os vetores AAV recombinantes (rAAV), integrais à terapia genética, substituem o genoma viral por um cassete de expressão selecionado, ladeado por repetições terminais invertidas virais (ITRs). Nas últimas três décadas, os rAAVs ganharam destaque em ensaios clínicos em humanos, principalmente por sua segurança e propriedades não imunogênicas. Eles infectam células em divisão e não em divisão, garantindo a expressão gênica de longo prazo. A manutenção episomal dos genomas rAAV elimina o risco de mutagênese insercional, e a expressão transgênica sustentada tem sido observada por vários meses a anos³¹.

O tropismo distinto do AAV, particularmente AAV1, AAV6, AAV8 e AAV9, que exibem cardiotropismo, os posiciona como vetores favoráveis para aplicações cardiovasculares. No entanto, as limitações incluem seu pequeno tamanho de inserção, cinética lenta e níveis modestos de expressão gênica. Preocupações sobre respostas imunes, tanto preexistentes quanto adquiridas, surgiram, com estudos destacando discrepâncias de soroprevalência entre sorotipos de AAV³³.

As respostas imunes podem impactar células que expressam transgenes, levando a investigações sobre estratégias para mitigar essas reações. As estratégias abrangem expressão específica de tecido, imunossupressão temporária, modificação de capsídeo e troca de sorotipo. Apesar desses desafios, pesquisas buscam soluções inovadoras para aumentar a viabilidade clínica da terapia genética de AAV, oferecendo caminhos promissores para superar respostas imunes e avançar aplicações terapêuticas³³.

3.2 Agentes terapêuticos e transportadores

Os agentes terapêuticos entregam seus materiais terapêuticos ao local alvo e podem ser administrados por conta própria. Os transportadores facilitam a entrega e o direcionamento de um agente efetor. Vários agentes efetores podem ser categorizados em nucleotídeos, moléculas, vesículas extracelulares (EVs), células e tecidos para intervenções terapêuticas. O RNA mensageiro modificado por nucleosídeo (modRNA), caracterizado por uma estrutura de fita simples com nucleotídeos modificados, permite a expressão imediata e de curto prazo, com duração de quase duas semanas, exibindo uma baixa resposta imunológica³⁴.

O miRNA é um RNA curto e não codificador, que regula a expressão gênica e varia em estabilidade. O anti-microRNA (anti-miR) serve como um inibidor antisense visando miRNAs específicos. Os plasmídeos de DNA oferecem expressão de curto prazo com uma resposta imunológica moderada, enquanto os vírus adeno-associados fornecem expressão de longo prazo com baixa reatividade imunológica. Os lentivírus, contendo RNA de fita simples, também garantem a expressão de longo prazo com uma resposta imunológica moderada. Os adenovírus, com DNA de fita dupla, produzem expressão de curto prazo (1 a 4 semanas), acompanhada por uma resposta imunológica robusta. Pequenos compostos – o sistema tetraciclina ou doxíciclina – apresentam uso comum em estudos experimentais³⁴.

Peptídeos ou proteínas, a exemplo de citocinas como fator de crescimento de fibroblastos e eritropoietina, passam por testes para tratamento de DCV. EVs, incluindo exossomos, servem como vesículas contendo ácidos nucleicos terapêuticos e/ou proteínas, fornecendo expressão de curto prazo com baixa resposta imune. Células ou tecidos, administrados intracoronariamente, carregam riscos potenciais de obstrução microvascular, com a maioria das células eliminadas em horas, mas as células restantes potencialmente enxertadas

para efeitos de longo prazo. Tecidos, derivados de diversos tipos de células-tronco, precisam de acesso cirúrgico epicárdico para implantação³⁴.

Esta classificação ressalta as diversas modalidades disponíveis para intervenções terapêuticas direcionadas às DCVs. Portadores desempenham um papel relevante no aprimoramento da entrega de agentes efetores. EVs, particularmente exossomos, podem servir como portadores eficazes, encapsulando vírus como vírus adeno-associados³⁵. Também contam com propriedades não imunogênicas, e suas modificações de superfície ou integração com células doadoras bioengenheiradas aumentam sua versatilidade³⁶.

Os lipossomas, caracterizados por cápsulas de bicamada fosfolipídica, exibem heterogeneidade em tamanho, eficácia de transdução limitada e baixa especificidade de alvo. Polímeros biodegradáveis, como ácido polilático e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), têm amplo uso como transportadores³⁴. Os hidrogéis, representando géis coloidais hidrofílicos, demonstram a capacidade de reter vetores virais, proteínas e até mesmo células, facilitando a liberação controlada e localizada. Essa gama diversificada de transportadores reforça sua importância na otimização da administração de agentes terapêuticos, oferecendo várias opções com vantagens e aplicações distintas³⁷.

3.3 Terapêutica de RNA (vetores não virais)

Os RNAs, incluindo variantes codificadoras e não codificadoras de proteínas, como lncRNAs, miRNAs e circRNAs, surgiram como terapêuticas promissoras para várias doenças, incluindo DCV. Desafios como estabilidade e imunogenicidade do RNA foram abordados ao longo do tempo, levando a aprovações da FDA para medicamentos baseados em siRNA (patisiran, givosiran) e vacinas COVID-19 baseadas em mRNA^{38,39}. O foco no mRNA, uma molécula de fita simples que traduz sequências genéticas em proteínas, ganhou força após superar os desafios de estabilidade⁴⁰.

A substituição de pseudouridina no mRNA, iniciada em 2008, por Karikó et al⁴⁰, melhorou a tradução e a evasão imunológica. O modRNA, sintetizado com substituição de 100% da uridina por N1-metilpseudouridina-5'-trifosfato, demonstra expressão rápida, altamente eficaz, controlada por dose, transitória, segura e resistente à RNase⁴⁰. Em células cardíacas, o modRNA exibe tradução rápida, pico de expressão entre 12 e 48 h e cinética transitória. Sua expressão controlada e incapacidade de integração ao genoma tornam o modRNA uma plataforma promissora de terapia genética para várias doenças, incluindo condições cardíacas^{41,42}.

Avanços recentes em biologia de RNA, estabilidade e sistemas de entrega impulsionaram plataformas de entrega de genes baseadas em mRNA totalmente sintéticas. A potência, segurança e não imunogenicidade do ModRNA em modelos animais, incluindo animais de grande porte, o tornam uma opção atraente para terapia regenerativa⁴³. O resultado promissor das vacinas COVID-19 baseadas em mRNA em testes em humanos reforça ainda mais o potencial do mRNA como uma ferramenta de terapia genética segura e eficaz. A natureza sintética e os processos de fabricação padronizados abrem caminho para a produção em larga escala para testes em humanos extensivos e aplicações clínicas, reduzindo tempo e custos³⁰.

4. TERAPÊUTICA ESPECÍFICA DE CÉLULAS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A terapia genética específica para células é desejável para DCV para aumentar a precisão e eficácia do tratamento, minimizando potenciais efeitos fora do alvo. O sistema cardiovascular é composto por diversos tipos de células, incluindo cardiomiócitos, células endoteliais, células imunes, fibroblastos e células musculares lisas, cada uma com funções únicas. Atingir a especificidade celular, nesse caso, é essencial para evitar consequências não intencionais e melhorar a segurança e eficácia geral da terapia. Algumas razões pelas quais a terapia genética específica para células é indicada para DCV correspondem a^{41,43}:

Alvo preciso – diferentes tipos de células do sistema cardiovascular desempenham papéis distintos, e atingir um tipo específico de célula, como cardiomiócitos, pode maximizar o impacto terapêutico. Ao usar plataformas específicas de células, a terapia genética pode ser desenvolvida para expressar seletivamente genes na população de células desejada, garantindo que o gene terapêutico seja expresso onde é mais necessário.

Minimização de efeitos fora do alvo – a transdução não específica de células fora do alvo pretendido pode levar a efeitos e potenciais reações adversas. A terapia genética específica para células ajuda a minimizar esses efeitos ao restringir a expressão do transgene ao tipo de célula específico relevante para a patologia da doença, reduzindo o risco de consequências não intencionais.

Perfil de segurança aprimorado – atingir especificidade celular contribui para o perfil de segurança da terapia genética. Ao minimizar interações com células não-alvo, a terapia tem menos probabilidade de desencadear respostas imunes ou causar efeitos fisiológicos não intencionais em tecidos não relacionados, contribuindo para a segurança geral e tolerabilidade do tratamento.

Resultados terapêuticos otimizados – as DCVs geralmente envolvem populações celulares específicas, que contribuem para a progressão da doença ou complicações. A terapia genética específica para células permite a modulação precisa desses alvos celulares, potencialmente levando a resultados terapêuticos mais eficazes ao abordar as causas raiz da doença.

Portanto, a terapia genética específica para células para DCV contribui para direcionamento de precisão, minimizando efeitos fora do alvo, melhorando o perfil de segurança e otimizando resultados terapêuticos. Essa abordagem tem grande potencial para desenvolver tratamentos personalizados e eficazes para várias condições cardiovasculares^{41,43}.

O AAV9, por sua vez, é uma promessa no campo da terapia genética devido a sua capacidade de transduzir efetivamente vários tecidos, incluindo o coração. Alavancando promotores específicos de células, o AAV9 permite a expressão exclusiva de transgenes em células específicas, aumentando a precisão em intervenções terapêuticas. Apesar dessas vantagens, a terapia genética AAV apresenta certas limitações. Uma restrição é sua tendência a se integrar ao cromossomo, o que levanta preocupações sobre potenciais efeitos de longo prazo. Além disso, o AAV tem uma capacidade de inserção de genes restrita, tornando-o inadequado para expressar genes grandes que excedem 4,5 quilobases⁴⁴.

A duração da expressão do transgene no coração é prolongada, geralmente ultrapassando um ano. No entanto, essa expressão prolongada está associada a desvantagens conhecidas, incluindo a indução de hipertrofia cardíaca e arritmias. Uma parcela significativa da população, excedendo 60%, também abriga anticorpos neutralizantes contra AAVs, impondo uma restrição ao seu uso generalizado em aplicações de terapia genética⁴⁵.

5. PAPÉIS DA MODIFICAÇÃO DO RNA NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A DCV corresponde a uma série de doenças que afetam o coração e os vasos sanguíneos, contribuindo para uma grande carga global de doenças. A prevalência e a mortalidade de DCV tem aumentado em pacientes com mais de 40 anos, sendo hipertensão e a aterosclerose importantes fatores de risco para outras DCVs^{46,47}. As causas mais comuns de mortes relacionadas a DCV atualmente incluem doença cardíaca isquêmica (DIC), fibrilação atrial (FA), cardiomiopatia, cardiopatia hipertensiva, endocardite, miocardite e outras. A doença cardíaca isquêmica (DIC), e o acidente vascular cerebral (AVC) são os principais responsáveis. Vários estudos revelaram que as modificações de RNA e seus reguladores desempenham papéis essenciais na DCV⁴⁸.

5.1 Hipertensão

A hipertensão é o principal fator de risco mundial para DCV, mas é evitável⁴⁷. Sua ocorrência está ligada a fatores genéticos e ambientais. Os reguladores da pressão arterial (PA) são diversos e muito complexos, envolvendo o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o sistema nervoso simpático (SNS), o sistema imunológico e o estresse oxidativo, além da regulação a função das células musculares lisas vasculares (VSCMs)⁴⁹. O ADAR2 – que tem atividade enzimática para edição de RNA A-to-I – é relatado como o principal responsável pela edição de FLNA no sistema cardiovascular, onde regula a contração do músculo liso. Camundongos com edição pré-mRNA de FLNA prejudicada mostraram hipertensão diastólica⁵⁰.

Variantes genéticas comuns da proteína associada à massa gorda e à obesidade (FTO) estão associadas à regulação da PA em pacientes com hipertensão⁵¹. No entanto, ainda não está claro se ele atua em N6-metiladenosina (m6A). Estudos demonstraram indiretamente que a modificação do RNA pode estar envolvida no desenvolvimento da hipertensão. Por exemplo, HuR é um executor chave para funções biológicas de m6A, uridilação e edição de RNA A-to-I, interagindo com locais de modificação. O HuR é reduzido na aorta de pacientes com hipertensão, e camundongos HuR-cKO específicos desenvolvem hipertensão e hipertrofia cardíaca. O HuR supostamente se liga a AREs no mRNA da caveolina-1 e no mRNA solúvel da guanilil ciclase (sGC) e regula a PA^{52,53}.

5.2 Aterosclerose e doença arterial coronariana

A aterosclerose é uma doença inflamatória caracterizada pelo acúmulo de gordura e fibras nas artérias da parede, conhecida como placa aterosclerótica. Fibrose e calcificação ocorrem na coronária, levando ao sangramento da placa, ruptura e trombose, o que impede o fluxo sanguíneo e, por fim, resulta em DAC. A DAC inclui principalmente infarto agudo do miocárdio (IAM), angina pectoris crônica estável, DAC crônica e insuficiência cardíaca (IC)⁴⁶. A modificação da m6A envolve cascatas inflamatórias em sítios extravasculares e células endoteliais vasculares (CEs), iniciando e progredindo a aterosclerose. A m6A METTL3 e METTL14 são reguladas positivamente em modelos de aterosclerose e pacientes com DAC. Além disso, a m6A promove a adesão de monócitos a CEs^{54,55}.

Mecanicamente, Chien et al⁵⁴ descobriram que, em um modelo EC induzido por tensão de cisalhamento oscilatório (OS), o aumento da expressão de METTL3 promove a estabilidade de m6A-NLRP1 mRNA por YTHDF1, enquanto aumenta a degradação de m6A-KLF4 mRNA por YTHDF2. Além disso, METTL14 medeia modificação a m6A do fator de transcrição FOXO1 mRNA em CEs, induzidas por TNF- α e promove a tradução de mRNA FOXO1 por YTHDF1, ativando assim a transcrição VCAM-1 e ICAM-1⁵⁵. A expressão de VCAM-1 e ICAM-1 também pode ser regulada por lncRNA NEAT1, que é estabilizado pelo AUF1 (um RBP) de uma maneira dependente da edição de RNA A-to-I mediada por ADAR1⁵⁶.

No entanto, o mecanismo subjacente não é claro. A inflamação dos macrófagos também é regulada por m6A. METTL14-KD reduz significativamente a estabilidade do mRNA MyD88 em macrófagos, o que promove a polarização do macrófago M2 e inibe a migração e adesão de macrófagos, inibindo a sinalização NF- κ B/IL-6⁵⁷. METTL3-m6A-YTHDF2 regula positivamente a inflamação induzida por lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) de macrófagos e monócitos⁵⁸. ADAR1 e METTL3/14 também afetam a angiogênese e a calcificação vascular ou valvar⁵⁹.

Além da resposta inflamatória e da função vascular, a modificação do RNA regula a função cardíaca na DAC. Por exemplo, a diminuição da expressão de CUGBP1 em modelos de IAM é atribuída à realocização citoplasmática de HuR e interação com AREs em CUGBP1 3'UTR⁶⁰. A superexpressão de CUGBP1 melhora a função cardíaca em camundongos com IM modulando o VEGF-A. O RNA interativo com piwi (piRNA) interage diretamente com o NAT10 e promove a apoptose do cardiomiócito (CM), aumentando o ac4C acetilação do fator de transcrição CE (TFEC), que resulta em deterioração da função cardíaca no IM⁶¹.

Os níveis de m6A aumentam com a expressão de FTO regulada negativamente em IC e CMs de mamíferos que sofrem de hipóxia, em vez de fibroblastos cardíacos (FCs) ou CEs. A superexpressão de FTO melhora a contração do sarcômero, regulando o Ca²⁺ intracelular e a função cardíaca após infarto do miocárdio, devido à desmetilação mediada por FTO do mRNA de ATP2A2 (que codifica a proteína SERCA2a) em resposta ao aumento dos níveis de mRNA de ATP2A2. Da mesma forma, a superexpressão de ALKBH5 alivia a função cardíaca pós-infarto do miocárdio e promove a proliferação de CM, por meio do eixo m6A-YTHDF1-YAP^{62,63}.

O METTL3-m6O A-HNRNPA2B1 também promove a biogênese do miR-503 encapsulado em vesícula extracelular (EV) derivado de CEs no IAM, o que causa apoptose do CM e a disfunção cardíaca. A lesão de isquemia-reperfusão (I/R) é uma complicação grave da isquemia cardíaca, que resulta em deterioração da DAC. O METTL3 regulado positivamente no modelo de lesão cardíaca I/R facilita a ligação do HNRNPD a m6A e mRNA de A-TFEB com estabilidade aprimorada, prejudicando a autofagia e promovendo a apoptose em CMs. Além disso, o TFEB ativa a transcrição de ALKBH5 e inibe a estabilidade do METTL3, formando assim um ciclo de feedback negativo. O METTL14-cKO específico para o coração, por sua vez, alivia a lesão de I/R e a disfunção cardíaca em corações de camundongos, com diminuição da expressão de marcadores de IC, como ANP, BNP e β -MHC⁶⁴⁻⁶⁶.

5.3 CARDIOMIOPATIA

A cardiomiopatia pode ser classificada em dois tipos: primária e secundária. A cardiomiopatia primária inclui a cardiomiopatia hipertrófica (CMH), cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (CAVD), cardiomiopatia dilatada (CMD), cardiomiopatia restritiva (MCR) e miocardite. Múltiplas alterações genéticas que causam cardiomiopatia primária são identificadas e validadas. Quase 70% dos pacientes com CMH apresentam mutações na cadeia pesada de β -miosina (MYH7) e na proteína C de ligação à miosina (MYBPC3)^{67,68}.

Troponina T (TNNT2), cadeia pesada de α -miosina (MYH6), titina (TTN), proteína LIM muscular (CSRP3), teletonina (TCAP), vinculina (VCL) e junctofilina 2 (JPH2), foram outros genes relacionados descobertos. As mutações TTN, MYH7 e TNNT2 também levam à CMD e

MCR^{69,70}. Genes também relacionados ao CMD correspondem a LMNA, RBM20 e BAG3. Tm prejudicado, mediado por mutação GTPBP3 ou MTO15A formação de U em tRNAs mitocondriais e disfunção mitocondrial, resulta em CMH. O PTC1-cKO específico do coração causa CMD, pois o PTC1 é essencial para a pseudouridina (Ψ) no rRNA 16S, na posição 2509, e a estabilidade do rRNA 16S, que afeta a montagem da LSU, a função mitocondrial e a sinalização mTOR seguinte^{71,72}.

Gao et al⁷³ observaram que YTHDC1-cKO específico cardíaco leva à CMD. Além disso, a deleção YTHDC1 resulta em um splicing aberrante do m6ATTN, com uma proporção aumentada de isoformas N2BA:N2B. Gonzalez et al⁷⁴ relataram que o ADAR1-cKO específico do coração causa miocardite autoinflamatória, levando eventualmente à CMD em camundongos. Além disso, a deficiência de IFIH1 (codificando MDA5) protege contra CMD e IC, inibindo os processos autoinflamatórios causados pela ausência de edição de RNA mediada por ADAR1.

A etiologia da cardiomiopatia secundária geralmente é adquirida e inclui diabetes, sepse e cardiotoxicidade. Na cardiomiopatia diabética, a METTL14 é regulada negativamente e medeia a piroptose do CM por meio da via NLRP3-caspase-1. Funcionalmente, a hipermetilação mediada por METTL14 do lncRNA TINCR promove o decaimento do TINCR pelo YTHDF2, o que enfraquece a inibição do TINCR no alvo NLRP3. O lncRNA Airn alivia a fibrose cardíaca na cardiomiopatia diabética, inibindo a degradação da ubiquitinação do IMP2 (codificado por IGF2BP2) e estabilizando o mRNA do p53 em um m6A. METTL14 parece ser um fator de risco na doxorrubicina⁷⁵⁻⁷⁷.

5.4 HIPERTROFIA CARDÍACA E INSUFICIÊNCIA TÉRMICA

A hipertrofia cardíaca, tanto fisiológica quanto patológica, é o aumento do coração e dos CMs, devido à adaptação ao estresse cardíaco. É relatado que na hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício, o mRNA total e os níveis de m6A no coração são reduzidos, possivelmente devido à regulação negativa METTL14. A hipertrofia cardíaca patológica é um dos principais contribuintes para a IC com fração de ejeção preservada (ICFEP) ou fração de ejeção reduzida (ICFER)^{78,79}. O FTO-cKO específico do coração deteriora a ICFEP induzida por cirurgia de constrição aórtica transversa (TAC) em camundongos. A superexpressão de FTO, por sua vez, atenua a hipertrofia cardíaca induzida por constrição aórtica transversa (CAT) e IC⁸⁰.

Dorn et al⁸¹ descobriram que a superexpressão de METTL3 induz um fenótipo de hipertrofia cardíaca compensatória sem alterações patológicas, mesmo sob estímulos de estresse, como sobrecarga de pressão. O METTL3-cKO específico para o coração resulta em IC ou agrava a IC induzida por estresse em camundongos. O piRNA CHAPIR é identificado como o estimulante de METTL. O CHAPIR regula a hipertrofia cardíaca interagindo com o METTL3 e inibindo sua atividade da metilase, levando à hipometilação do mRNA da ADP-ribosiltransferase Parp10 e à inibição da degradação mediada por YTHDF2⁸².

Além disso, o MYH7, um marcador de hipertrofia cardíaca, também é alvo de YTHDF2. YTHDF2 é regulado positivamente na IC e promove a estabilidade de MYH7 em um m6A⁸³. Com base na técnica de sequenciamento, Kokot et al⁸⁴ explorou a regulação de circRNAs por edição de RNA A-to-I em corações humanos com falha. Seus resultados mostraram que a IC leva à diminuição da edição de RNA, com redução da proteína ADAR2 e aumento da formação de circRNA.

5.5 Outras condições cardiovasculares

A hipertensão pulmonar (HP) pode ser dividida em cinco grupos. A HP do grupo 2 é causada por doença cardíaca esquerda, que geralmente é complicada em mais de 50% dos pacientes com ICFEP ou ICFER⁸⁵. A HP é caracterizada pela proliferação e resistência à apoptose das células musculares lisas da artéria pulmonar. Essa mudança fenotípica leva à remodelação vascular pulmonar (RVP)⁸⁶. Na HP, o aumento do RNA total e dos níveis de m6A são acompanhados por expressão elevada de METTL3/14 e YTHDF1/2^{87,88}.

Nesses casos, o METTL3/14 catalisa a metilação de genes a jusante associados à proliferação, enquanto o YTHDF1/2 promove sua tradução e degradação. Por exemplo, a translação de MAGED1 é regulada positivamente pelo eixo METTL3-m6A-YTHDF1.335 Funcionalmente, o MAGED1-KO inibe a proliferação de PSMC induzida por hipóxia e melhora a RVP e a função cardíaca em camundongos expostos a SU5416/hipóxia (Su/Hx). A inflamação crônica também contribui para a RVP. YTHDF2 supostamente regula positivamente em macrófagos pulmonares de HP e promove a proliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar, elevando a degradação de m6A-HMOX1, que ativa macrófagos, a resposta

inflamatória e o estresse oxidativo. O YTHDF2-cKO, específico para mieloides, inibe a ativação de macrófagos, RVP e disfunção cardíaca em camundongos com HP induzida por Su/Hx⁸⁹.

Arritmias graves, como taquicardia ventricular (TV), fibrilação ventricular (FV) e FA, podem levar à morte. Entre elas, as arritmias ventriculares (AVs), incluindo TV e FV, são as principais causas de morte súbita cardíaca (MSC), enquanto a FA geralmente está relacionada ao AVC e à IC. Pacientes com IM ou IC são observados com aumento da atividade nervosa simpática, o que pode levar a arritmias frequentes⁹⁰. Em modelos animais de IM, os níveis de expressão de METTL3 são regulados positivamente no coração e no núcleo paraventricular (PVN), a região reguladora cardiovascular no cérebro, e são responsáveis por receber informações do reflexo cardíaco e regular a atividade nervosa simpática para feedback^{91,92}.

Está associada à ativação da via NF-κB, mediada por TRAF6 e TLR4, respectivamente. Por outro lado, o silenciamento do METTL3 inibe a remodelação simpática e a hiperatividade, o que é benéfico para atenuar o IM e melhorar a função cardíaca. Da mesma forma, a expressão elevada de METTL3 também regula a fibrose cardíaca e a FA de maneira dependente de um m6A⁹³.

A dissecação da aorta (DA) é uma doença perigosa e fatal. Hipertensão e aterosclerose são os principais fatores de risco para DA, enquanto a perda de células do músculo liso aórtico é uma de suas características. Foi relatado que a expressão de METTL3/14 é significativamente aumentada com a redução da expressão de FTO nas aortas de pacientes com DA tipo A de Stanford em comparação com aortas sem DA. O METTL3 pode promover a ferroptose em células do músculo liso aórtico humanos, facilitando a degradação de m6A modificado em SLC7A11 e mRNA FSP1. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar as funções e mecanismos moleculares específicos da modificação m6A na DA^{94,95}.

6. TERAPÊUTICA BASEADA EM MODIFICAÇÃO DE RNA PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Os reguladores da modificação do RNA estão envolvidos na iniciação e desenvolvimento da DCV, afetando vários fenótipos de diferentes células no sistema cardiovascular e vias de sinalização associadas. Os princípios das estratégias terapêuticas baseadas em modificação de RNA para DCV incluem principalmente: inibir a resposta inflamatória, reduzir a perda celular, atenuar o dano e promover a regeneração ou aliviar a remodelação. Além disso, as estratégias terapêuticas baseadas em modificação de RNA podem atuar por meio de múltiplos mecanismos e levar a melhores resultados^{94,95}.

7. DESENVOLVIMENTO E REGENERAÇÃO CARDÍACA

A capacidade regenerativa do coração de mamíferos adultos é muito limitada. A perda de CMs pode ser permanente e difícil de reparar. Assim, estimular a desdiferenciação e proliferação de CM fornece uma perspectiva promissora para estratégias de regeneração cardíaca⁹⁶. A modificação RNA mediado por NSUN5 e de m5AC é necessária para a tradução de TPM1, um gene relacionado ao desenvolvimento cardíaco⁹⁷. A mutação NSUN5 pode causar diminuição da proliferação celular no trato de saída cardíaca (OFT) e malformações OFT em camundongos. Chen et al⁹⁸ explorou o papel da edição de RNA A-to-I na diferenciação de CMs humanos. Seus resultados mostraram que a proporção de locais de edição em 3'UTRs diminui gradualmente e vice-versa, e a proporção de locais de edição em íntrons aumenta durante o processo de células indiferenciadas para CMs diferenciados.

ADAR1 é essencial para o crescimento e desenvolvimento cardíaco embrionário. Moore et al⁹⁹ observaram que ADAR1-cKO resulta em apoptose, proliferação reduzida de CM e morte embrionária. Han et al¹⁰⁰ constataram que o total dos níveis de m6A aumentam com a redução da expressão de ALKBH5, durante a diferenciação de células do mesoderma (MESs) em CMs. Yang et al¹⁰¹, por sua vez, verificaram que o pico de metilação no coração de camundongos aumenta após o nascimento e pode se estabilizar após 7 dias. Além disso, YTHDF1 e YTHDF3 são regulados negativamente durante a diferenciação de células-tronco embrionárias (ESCs) em CMs¹⁰².

No entanto, YTHDF1 e YTHDF3 regulam a expressão de genes cardíacos em CMs de maneiras opostas. Comparado aos corações embrionários, uma modificação de m6A aumenta a expressão de miR-133a e miR-499 em corações de camundongos pós-natais, estimulando assim a inibição de genes-alvo envolvidos no desenvolvimento cardíaco¹⁰³. Os reguladores do ciclo celular, como ciclinas, quinases independentes do ciclo celular (CDKs) e proto-oncoproteínas, promovem a proliferação de CM. ALKBH5 causa a proliferação de CM, regulando positivamente

a expressão de YAP, enquanto METTL3 inibe a expressão de YAP por meio de uma regulação negativa⁹⁶.

Especificamente, ALKBH5 é uma desmetilase de YAP e realiza sua tradução de maneira dependente de YTHDF1. Além disso, a metilação mediada por METTL3 de pri-miR-143 facilita sua maturação e inibe a expressão de YAP¹⁰⁴. A injeção in vivo do vírus adeno-associado 9 (AAV9)-shMETTL3 causa a proliferação de CM e a regeneração cardíaca no coração lesionado, mas não tem efeito significativo no coração sem lesão¹⁰⁵. Além disso, acredita-se que METTL14 também seja benéfica para a apoptose e prejudicial à proliferação do CM, estimulando a interação de YTHDF1 com m6MRNA A-PHLPP2 com tradução melhorada¹⁰⁶. No entanto, o ALKBH5 regula negativamente a angiogênese nas células endoteliais microvasculares cardíacas, prejudicando a recuperação do fluxo sanguíneo em doenças isquêmicas¹⁰⁷.

8. PREVENÇÃO DA PERDA E REMODELAÇÃO CELULAR

A perda celular é uma das bases patológicas críticas em várias DCV. Por exemplo, a perda de CMs leva à fibrose, diminuição da contração cardíaca e dilatação cardíaca patológica, conhecida como remodelação cardíaca patológica, que posteriormente deteriora esses processos e, por fim, resulta em IC¹⁰⁸. As principais causas de perda celular em DCVs incluem apoptose, necrose, ferroptose e piroptose¹⁰⁹. Cheng et al¹¹⁰ desenvolveram um nanomedicamento para melhorar a lesão de I/R do miocárdio com base no inibidor de ALKBH5 IOX1, chamado HSSS-I. Uma vantagem do HSSS-I é que ele pode atingir a área do infarto e inibir a apoptose. Além disso, o exercício pode melhorar significativamente a função cardíaca, atenuando a edição de RNA e a apoptose m6A¹¹¹.

O exercício também alivia a aterosclerose, inibindo a piroptose EC regulada por A¹¹². O jejum intermitente também pode inibir a apoptose do MC na cardiomiopatia da obesidade induzida por dieta hiperlipídica, por meio de um mecanismo semelhante. Embora seja improvável que o exercício e o jejum intermitente sejam tratados clinicamente, eles podem beneficiar os pacientes como estratégias de gerenciamento de saúde. A injeção na veia da cauda de lentivírus (LV)-shMETTL3 inibe significativamente a piroptose em modelos de camundongos com lesão de I/R do miocárdio¹¹³.

A liproxstatina-1, um inibidor da ferroptose, inibe a degeneração medial induzida pela β -aminopropionitrila (BAPN) e a fragmentação da elastina na aorta, reduzindo significativamente a morbidade e a mortalidade⁸⁶. Da mesma forma, o MCC950, um inibidor da piroptose, atenua parcialmente a lesão cardíaca na cardiomiopatia diabética. Não está claro se esses inibidores afetam diretamente a modificação do RNA ou podem atuar nos alvos modificados ou a jusante. Além disso, a superexpressão de AAV9-shMETTL3 ou AAV9-FTO por injeção intravenosa inibe a disfunção cardíaca e o remodelamento em modelos de camundongos de hipertrofia miocárdica¹¹⁴.

9. OUTRAS CONDIÇÕES CARDIOVASCULARES

A proliferação celular nem sempre é benéfica para DCV em todos os casos. Por exemplo, a proliferação aberrante de m6A resulta em fibrose cardíaca. A injeção de LV-shMETTL3 ou LV-shYTHDF2, por sua vez, alivia significativamente a fibrose cardíaca induzida por isoproterenol (ISO) em camundongos¹¹⁵. A prevenção da proliferação da formação células musculares lisas da aorta e de neointima após colocação de stent ou cirurgia de revascularização do miocárdio melhora os resultados dos pacientes. Uma modificação mediada por METTL3 promove a formação de autofagossomos para suprimir a proliferação de células musculares lisas da aorta, sugerindo METTL3 como um potencial alvo terapêutico¹¹⁶.

Um ensaio clínico mostrou que o trióxido de arsênio pode ser aplicado a stents farmacológicos com eficácia e segurança comparáveis aos tradicionais eluidores de sirolimus¹¹⁷, enquanto Yu et al¹¹⁸ demonstraram que o trióxido de arsênio promove seletivamente a apoptose em formação células musculares lisas da aorta, regulando a modificação de m6A.

A aplicação e o mecanismo de extratos de algumas plantas naturais ou medicamentos tradicionais chineses para DCV com base na modificação do RNA também conquistaram atenção. O ácido maslínico (MA), um triterpenoide pentacíclico rico em pericarpo verde-oliva, inibe a hipertrofia cardíaca diminuindo a expressão de METTL3. No entanto, esse mecanismo não foi esclarecido¹¹⁹. Tanshinone IIA (Tan IIA), um extrato da medicina tradicional chinesa *Salvia miltiorrhiza* Bunge, inibe a modificação da m6A mediada por ALKBH5. A galectina-3 pode ter um efeito semelhante para DCV¹²⁰.

REFERÊNCIAS

1. Wolfram JA, Donahue JK. Gene therapy to treat cardiovascular disease. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000119.
2. Lucas T, Bonauer A, Dimmeler S. RNA therapeutics in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2018;123:205–20.
3. Huang CK, Kafert-Kasting S, Thum T. Preclinical and clinical development of noncoding RNA therapeutics for cardiovascular disease. *Circ Res.* 2020;126:663–78.
4. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun.* 2018;9:1911.
5. Zhang M, Bahal R, Rasmussen T, Manautou J, Zhong X. The growth of siRNA-based therapeutics: updated clinical studies. *Biochem Pharmacol.* 2021;189:114432.
6. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector S, Rouphael N, Creech CB, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384:403–16.
7. Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther.* 2008;16:1833–40.
8. Crick FH. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138–163.
9. Ohno S. So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symp Biol.* 1972;23:366–370.
10. Anderson DM, Makarewich CA, Anderson KM, et al. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. *Sci Signal.* 2016;9:ra119.
11. Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science.* 2016;351:271–275.
12. Wu P, Mo Y, Peng M, et al. Emerging role of tumor-related functional peptides encoded by lncRNA and circRNA. *Mol Cancer.* 2020;19:22.
13. Azodi M, Kamps R, Heymans S, Robinson EL. The missing “lnc” between genetics and cardiac disease. *Noncoding RNA.* 2020;6(1):3.
14. Christofi T, Zaravinos A. RNA editing in the forefront of epitranscriptomics and human health. *J Transl Med.* 2019;17:319.
15. Da Costa Martins PA, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2012;93:563–572.
16. Xun Y, Tang Y, Hu L, et al. Purification and identification of miRNA target sites in genome using DNA affinity precipitation. *Front Genet.* 2019;10:778.
17. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 2008;22:3242–3254.
18. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;324:1710–1713.
19. Kilikevicius A, Meister G, Corey DR. Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(2):617–634.

20. Kim T-K, Hemberg M, Gray JM, et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. 2010;465:182–187.
21. Uszczynska-Ratajczak B, Lagarde J, Frankish A, Guigo R, Johnson R. Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat Rev Genet*. 2018;19:535–548.
22. Chen G, Wang Z, Wang D, et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:D983–D986.
23. Quek XC, Thomson DW, Maag JL, et al. lncRNADB v2.0: expanding the reference database for functional long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D168–D173.
24. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol*. 2014;32: 453–461.
25. Carrara M, Fuschi P, Ivan C, Martelli F. Circular RNAs: methodological challenges and perspectives in cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med*. 2018;22:5176–5187.
26. Bai Y, Zhang Y, Han B, et al. Circular RNA DLGAP4 ameliorates ischemic stroke outcomes by targeting miR-143 to regulate endothelial-mesenchymal transition associated with blood-brain barrier integrity. *J Neurosci*. 2018;38:32–50.
27. Tan WL, Lim BT, Anene-Nzeli CG, et al. A landscape of circular RNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res*. 2017;113:298–309.
28. Vausort M, Salgado-Somoza A, Zhang L, et al. Myocardial infarction-associated circular RNA predicting left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:1247–1248.
29. Rapti K, Chaanine AH, Hajjar RJ. Targeted gene therapy for the treatment of heart failure. *Can J Cardiol*. 2011;27:265–83.
30. Flotte T. Gene therapy: The first two decades and the current state-of-the-art. *J Cell Physiol*. 2007;213:301–5.
31. Lyon AR, Sato M, Hajjar RJ, Samulski RJ, Harding SE. Gene therapy: Targeting the myocardium. *Heart*. 2008;94:89–99.
32. Davis J, Westfall MV, Townsend D, Blankinship M, Herron TJ, Guerrero-Serna G, Wang W, Devaney E, Metzger JM. Designing heart performance by gene transfer. *Physiol Rev*. 2008;88:1567–651.
33. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*. 2008;16:1073–80.
34. Adamiak M, Sahoo S. Exosomes in Myocardial Repair: Advances and Challenges in the Development of Next-Generation Therapeutics. *Mol Ther*. 2018;26:1635–43.
35. Li X, La Salvia S, Liang Y, Adamiak M, Kohlbrenner E, Jeong D, Chepurko E, Ceholski D, Lopez-Gordo E, Yoon S, et al. Extracellular Vesicle–Encapsulated Adeno-Associated Viruses for Therapeutic Gene Delivery to the Heart. *Circulation*. 2023;148:405–25.
36. Cecchin R, Troyer Z, Witwer K, Morris KV. Extracellular vesicles: The next generation in gene therapy delivery. *Mol Ther*. 2023;31:1225–30.
37. Zhong R, Talebian S, Mendes BB, Wallace G, Langer R, Conde J, Shi J. Hydrogels for RNA delivery. *Nat Mater*. 2023;22:818–31.
38. Zhang M, Bahal R, Rasmussen T, Manautou J, Zhong X. The growth of siRNA-based therapeutics: Updated clinical studies. *Biochem Pharmacol*. 2021;189:114432.

39. Baden L, El Sahly H, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector S, Rouphael N, Creech C, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384:403–16.
40. Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005;23:165–75.
41. Magadum A, Kurian AA, Chepurko E, Sassi Y, Hajjar RJ, Zangi L. Specific Modified mRNA Translation System. *Circulation*. 2020;142:2485–8.
42. Magadum A, Kaur K, Zangi L. mRNA-Based Protein Replacement Therapy for the Heart. *Mol Ther*. 2019;27:785–93.
43. Magadum A. Modified mRNA Therapeutics for Heart Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23:15514.
44. Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:87–104.
45. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: Overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*. 2013;122:23–36.
46. Roth GA, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:1–25.
47. Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2021;18:785–802.
48. Libby P, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5:56.
49. Touyz RM, et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2018;114:529–39.
50. Jain M, et al. RNA editing of Filamin A pre-mRNA regulates vascular contraction and diastolic blood pressure. *EMBO J*. 2018;37:e94813.
51. Marcadenti A, et al. Effects of FTO RS9939906 and MC4R RS17782313 on obesity, type 2 diabetes mellitus and blood pressure in patients with hypertension. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:103.
52. Liu S, et al. HuR (Human Antigen R) regulates the contraction of vascular smooth muscle and maintains blood pressure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40:943–57.
53. Klöss S, Rodenbach D, Bordel R, Mülsch A. Human-antigen R (HuR) expression in hypertension: downregulation of the mRNA stabilizing protein HuR in genetic hypertension. *Hypertension*. 2005;45:1200–6.
54. Chien CS, et al. METTL3-dependent N(6)-methyladenosine RNA modification mediates the atherogenic inflammatory cascades in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118:e2025070118.
55. Jian D, et al. METTL14 aggravates endothelial inflammation and atherosclerosis by increasing FOXO1 N6-methyladenosine modifications. *Theranostics*. 2020;10:8939–56.
56. Vlachogiannis NI, et al. Adenosine-to-inosine Alu RNA editing controls the stability of the pro-inflammatory long noncoding RNA NEAT1 in atherosclerotic cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2021;160:111–20.
57. Zheng Y, et al. Mettl14 mediates the inflammatory response of macrophages in atherosclerosis through the NF- κ B/IL-6 signaling pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79:311.

58. Sun Z, et al. Matr3 reshapes m6A modification complex to alleviate macrophage inflammation during atherosclerosis. *Clin Immunol.* 2022;245:109176.
59. Zhou T, et al. Factors influencing osteogenic differentiation of human aortic valve interstitial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021;161:e163–e185.
60. Gu L, et al. Reconstitution of HuR-Inhibited CUGBP1 expression protects cardiomyocytes from acute myocardial infarction-induced injury. *Antioxid Redox Signal.* 2017;27:1013–26.
61. Wang K, et al. PIWI-interacting RNA HAAPIR regulates cardiomyocyte death after myocardial infarction by promoting NAT10-mediated ac(4)C acetylation of Tfec mRNA. *Adv Sci.* 2022;9:e2106058.
62. Mathiyalagan P, et al. FTO-dependent N(6)-methyladenosine regulates cardiac function during remodeling and repair. *Circulation.* 2019;139:518–32.
63. Han Z, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1. *Theranostics.* 2021;11:3000–16.
64. Sun P, et al. Extracellular vesicle-packaged mitochondrial disturbing miRNA exacerbates cardiac injury during acute myocardial infarction. *Clin Transl Med.* 2022;12:e779.
65. Song H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m(6)A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes. *Autophagy.* 2019;15:1419–37.
66. Wang L, et al. METTL14 is required for exercise-induced cardiac hypertrophy and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Nat Commun.* 2022;13:6762.
67. McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies. *Circ Res.* 2017;121:722–30.
68. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet.* 2013;381:242–55.
69. Schultheiss HP, et al. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:32.
70. Muchtar E, Blauwet LA, Gertz MA. Restrictive cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Circ Res.* 2017;121:819–37.
71. Ghezzi D, et al. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet.* 2012;90:1079–87.
72. Perks KL, et al. PTC1 is required for 16S rRNA maturation complex stability and mitochondrial ribosome assembly. *Cell Rep.* 2018;23:127–42.
73. Gao S, et al. Depletion of m(6)A reader protein YTHDC1 induces dilated cardiomyopathy by abnormal splicing of Titin. *J Cell Mol Med.* 2021;25:10879–91.
74. Garcia-Gonzalez C, et al. ADAR1 prevents autoinflammatory processes in the heart mediated by IRF7. *Circ Res.* 2022;131:580–97.
75. Meng L, et al. METTL14 suppresses pyroptosis and diabetic cardiomyopathy by downregulating TINCR lncRNA. *Cell Death Dis.* 2022;13:38.
76. Peng T, et al. LncRNA Airn alleviates diabetic cardiac fibrosis by inhibiting activation of cardiac fibroblasts via a m6A-IMP2-p53 axis. *Biol Direct.* 2022;17:32.
77. Zhuang S, et al. METTL14 promotes doxorubicin-induced cardiomyocyte ferroptosis by regulating the KCNQ1OT1-miR-7-5p-TFRC axis. *Cell Biol Toxicol.* 2021.

78. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15:387–407.
79. Berulava T, et al. Changes in m6A RNA methylation contribute to heart failure progression by modulating translation. *Eur J Heart Fail.* 2020;22:54–66.
80. Zhang B, et al. m6A demethylase FTO attenuates cardiac dysfunction by regulating glucose uptake and glycolysis in mice with pressure overload-induced heart failure. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6:377.
81. Dorn LE, et al. The N(6)-methyladenosine mRNA methylase METTL3 controls cardiac homeostasis and hypertrophy. *Circulation.* 2019;139:533–45.
82. Gao XQ, et al. The piRNA CHAPIR regulates cardiac hypertrophy by controlling METTL3-dependent N(6)-methyladenosine methylation of Parp10 mRNA. *Nat Cell Biol.* 2020;22:1319–31.
83. Xu H, et al. YTHDF2 alleviates cardiac hypertrophy via regulating Myh7 mRNA decoy. *Cell Biosci.* 2021;11:132.
84. Kokot KE, et al. Reduction of A-to-I RNA editing in the failing human heart regulates formation of circular RNAs. *Basic Res Cardiol.* 2022;117:32.
85. Hoeper MM, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med.* 2016;4:306–22.
86. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:443–55.
87. Hu L, et al. YTHDF1 regulates pulmonary hypertension through translational control of MAGED1. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021;203:1158–72.
88. Liu P, et al. m(6)A modification-mediated GRAP regulates vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2022;67:574–88.
89. Hu L, et al. Ythdf2 promotes pulmonary hypertension by suppressing Hmox1-dependent anti-inflammatory and antioxidant function in alveolar macrophages. *Redox Biol.* 2023;61:102638.
90. Herring N, Kalla M, Paterson DJ. The autonomic nervous system and cardiac arrhythmias: current concepts and emerging therapies. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16:707–26.
91. Qi L, et al. m(6)A methyltransferase METTL3 participated in sympathetic neural remodeling post-MI via the TRAF6/NF- κ B pathway and ROS production. *J Mol Cell Cardiol.* 2022;170:87–99.
92. Qi L, et al. New insights into the central sympathetic hyperactivity postmyocardial infarction: Roles of METTL3-mediated m(6)A methylation. *J Cell Mol Med.* 2022;26:1264–80.
93. Zhou Y, et al. METTL3 boosts glycolysis and cardiac fibroblast proliferation by increasing AR methylation. *Int J Biol Macromol.* 2022;223:899–915.
94. Nienaber CA, et al. Aortic dissection. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16053.
95. Li N, et al. Targeting ferroptosis as a novel approach to alleviate aortic dissection. *Int J Biol Sci.* 2022;18:4118–34.
96. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:529–41.
97. Wang Y, et al. Mutations in RNA methyltransferase gene NSUN5 confer high risk of outflow tract malformation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:623394.

98. Chen J, et al. Global RNA editing identification and characterization during human pluripotent-to-cardiomyocyte differentiation. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021;26:879–91.
99. Moore JBT, et al. The A-to-I RNA editing enzyme Adar1 is essential for normal embryonic cardiac growth and development. *Circ Res*. 2020;127:550–2.
100. Han Z, et al. ALKBH5-mediated m(6)A mRNA methylation governs human embryonic stem cell cardiac commitment. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2021;26:22–33.
101. Yang Y, et al. Dynamic patterns of N6-methyladenosine profiles of messenger RNA correlated with the cardiomyocyte regenerability during the early heart development in mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:5537804.
102. Wang S, et al. Differential roles of YTHDF1 and YTHDF3 in embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *RNA Biol*. 2021;18:1354–63.
103. Qian B, et al. m6A modification promotes miR-133a repression during cardiac development and hypertrophy via IGF2BP2. *Cell Death Discov*. 2021;7:157.
104. Gong R, et al. Loss of m(6)A methyltransferase METTL3 promotes heart regeneration and repair after myocardial injury. *Pharmacol Res*. 2021;174:105845.
105. Jiang FQ, et al. Mettl3-mediated m(6)A modification of Fgf16 restricts cardiomyocyte proliferation during heart regeneration. *Elife*. 2022;11:e77014.
106. Wang L, et al. METTL14 is required for exercise-induced cardiac hypertrophy and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Nat Commun*. 2022;13:6762.
107. Zhao Y, et al. Loss of m6A demethylase ALKBH5 promotes post-ischemic angiogenesis via post-transcriptional stabilization of WNT5A. *Clin Transl Med*. 2021;11:e402.
108. Del Re DP, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease. *Physiol Rev*. 2019;99:1765–817.
109. Cheng P, et al. Amelioration of acute myocardial infarction injury through targeted ferritin nanocages loaded with an ALKBH5 inhibitor. *Acta Biomater*. 2022;140:481–91.
110. Liu K, et al. Exercise training ameliorates myocardial phenotypes in heart failure with preserved ejection fraction by changing N6-methyladenosine modification in mice model. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:954769.
111. Yang Q, et al. Exercise mitigates endothelial pyroptosis and atherosclerosis by downregulating NEAT1 through N6-methyladenosine modifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2023;43:910–26.
112. Xu Z, et al. Intermittent fasting improves high-fat diet-induced obesity cardiomyopathy via alleviating lipid deposition and apoptosis and decreasing m6A methylation in the heart. *Nutrients*. 2022;14:251.
113. Wang X, et al. Mechanism of METTL3-mediated m(6)A modification in cardiomyocyte pyroptosis and myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2023;37:435–48.
114. Zhang R, et al. METTL3 mediates Ang-II-induced cardiac hypertrophy through accelerating pri-miR-221/222 maturation in an m6A-dependent manner. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27:55.
115. Li T, et al. Silencing of METTL3 attenuates cardiac fibrosis induced by myocardial infarction via inhibiting the activation of cardiac fibroblasts. *FASEB J*. 2021;35:e21162.
116. Fang ZM, et al. Methyltransferase-like 3 suppresses phenotypic switching of vascular smooth muscle cells by activating autophagosome formation. *Cell Prolif*. 2023;56:e13386.

117. Shen L, et al. Nine-month angiographic and two-year clinical follow-up of novel biodegradable-polymer arsenic trioxide-eluting stent versus durable-polymer sirolimus-eluting stent for coronary artery disease. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128:768–73.
118. Yu H, et al. Arsenic trioxide activates yes-associated protein by lysophosphatidic acid metabolism to selectively induce apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2022;1869:119211.
119. Fang M, et al. Maslinic acid protects against pressure-overload-induced cardiac hypertrophy by blocking METTL3-mediated m(6)A methylation. *Aging (Albany NY)*. 2022;14:2548–57.
120. Zhang M, et al. Tanshinone IIA alleviates cardiac hypertrophy through m6A modification of galectin-3. *Bioengineered*. 2022;13:4260–70.