



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

**Papel de los IncRNAs en cardiopatías
estructurales y su función en el estrés del
retículo endoplasmático**

PRESENTADA

Autor: Francisco José Martínez Amaro

Directores de la tesis: Diego Franco Jaime/ Carlos García Padilla

Tutor de la tesis: Diego Franco Jaime

Departamento: Biología Experimental

Fecha: Septiembre/2024

ISBN:
Licencia CC

RUJJA

Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin la inestimable ayuda y colaboración de los componentes del Grupo de Investigación CVR, del departamento de Biología Experimental de la Universidad de Jaén, y de todas las personas con las que he tenido la oportunidad de trabajar durante estos años, tanto en España como en Francia.

Especialmente debo agradecer a mi tutor y codirector el Dr. Diego Franco Jaime, por brindarme esta oportunidad de completar mi formación académica, de permitirme incorporarme a su grupo, y brindarme sus consejos y tiempo. A mi codirector, el Dr. Carlos García Padilla, por toda su ayuda, apoyo y conocimientos, por su interés en orientarme en el complejo mundo de la ciencia, y por todas las charlas sobre la vida. Gracias a los dos por vuestra paciencia con las correcciones y vuestro interés.

Gracias a toda mi familia, a mis padres Miguel y Rafi, por su cariño y apoyo durante toda mi vida, por su esfuerzo para darme las mayores oportunidades posibles y por su apoyo constante, a mi hermano Miguel, por sus ánimos y su labor como mentor en muchos aspectos, por sus consejos y por recordarme que está ahí para lo que necesite durante toda mi vida, a su mujer Carolina y a mis sobrinos Miguel y Hernán, por su apoyo y alegría.

Finalmente, me gustaría dedicar y agradecer esta tesis a Ana Belén, mi pareja, la persona con la que he compartido buenos y malos momentos durante todo el tiempo, y en especial durante la realización de esta tesis. Gracias por tu apoyo, tus palabras de ánimo, tu cariño, todas esas conversaciones que hemos tenido en las que me dabas fuerzas, tus consejos, tus sacrificios, y en definitiva tu presencia en mi vida, no te puedes ni imaginar lo importante que eres. A sus padres, Antonio y Ani, por su cariño y consejos, y por acogerme en su hogar como uno más, gracias a toda su familia.

Muchas gracias a todos.



Universidad de Jaén

El Dr. Diego Franco Jaime, Catedrático del Área de Biología celular de la Universidad de Jaén, y el Dr. Carlos García Padilla, Personal investigador de la Universidad de Jaén, certifican que la Tesis Doctoral titulada: **“Papel de los lncRNAs en cardiopatías estructurales y su función en el estrés del retículo endoplasmático”**, que presenta Francisco José Martínez Amaro para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo a su juicio, los requisitos exigidos para su presentación.

Jaén, 28 de Julio de 2024

**FRANCO
JAIME
DIEGO -
27383269K** Firmado digitalmente por FRANCO JAIME DIEGO - 27383269K Fecha: 2024.07.28 20:27:14 +02'00'

Fdo. Diego Franco Jaime

**GARCIA
PADILLA
CARLOS -
26250047D** Firmado digitalmente por GARCIA PADILLA CARLOS - 26250047D Fecha: 2024.07.28 22:55:18 +02'00'

Fdo. Carlos García Padilla

Memoria presentada por el graduado Francisco José Martínez Amaro

Julio de 2024

Diego Franco Jaime
Catedrático de Biología Celular
Coordinador Programa de Doctorado Biología Molecular y Celular
Decano Facultad de Ciencias Experimentales
Campus Las Lagunillas, s/n - 23071 - Jaén
Tlf: +34 953 212 763
dfranco@ujaen.es

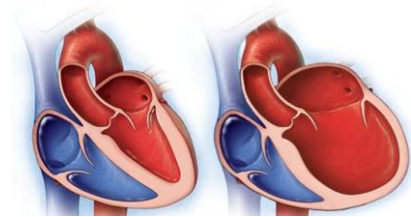
UJa.es

Índice

1. <u>Resumen/Abstract</u>	3-6
Resumen.....	5
Abstract.....	6
2. <u>Introducción</u>	7-47
2.1 Desarrollo cardiaco.....	9-11
2.2 Regulación molecular del desarrollo cardiaco.....	11-19
2.2.1 Factores de crecimiento.....	11-15
2.2.2 Factores de transcripción.....	15-19
2.3 Regulación post-transcripcional: ARNs no codificantes.....	19-26
2.3.1 MicroARNs.....	20-21
2.3.2 ARNs circulares (CircRNAs).....	21-22
2.3.3 ARNs largos no codificantes (lncRNAs).....	22-27
2.4 Enfermedades cardiacas.....	27-35
2.4.1 Infarto de miocardio (MI).....	28-29
2.4.2 Cardiomiopatía hipertrófica (HCM).....	30-31
2.4.3 Cardiomiopatía dilatada (DCM).....	31-34
2.4.4 Fibrilación atrial (AF).....	34-35
2.5 Estrés del retículo endoplasmático y vía UPR.....	35-47
2.5.1 Vía ATF6.....	37-38
2.5.2 Vía PERK.....	38-39
2.5.3 Vía IRE1.....	39-40
2.5.4 Contribución del estrés de RE en las enfermedades cardiovasculares.....	40-43
2.5.5 Regulación de los lncRNAs sobre la vía UPR en las enfermedades cardiovasculares.....	43-46
2.5.5.1 Hipoxia	
2.5.5.2 Infarto de miocardio e Isquemia/ reperusión (I/R)	
2.5.5.3 Hipertrofia cardiaca	
2.5.5.4 Cardiomiopatía dilatada	
2.6 lncRNA <i>Walras, Walar, Walaa, Walrad y Wallrd</i>	46-47

3. <u>Objetivos/Aims</u>	48-50
Objetivos.....	50
Aims.....	50
4. <u>Materiales y Métodos</u>	51-63
5. <u>Resultados</u>	64-97
5.1 Perfil de expresión de distintos lncRNAs en modelos de cardiomiopatía dilatada	66-68
5.2 Perfil de expresión de distintos lncRNAs en un modelo de cardiomiopatía hipertrófica.....	69-70
5.3 Papel regulador de la presencia de estrógenos (β -estradiol) sobre los niveles de expresión de los lncRNAs de interés.....	70
5.4 Perfil de expresión de los lncRNAs de interés en un modelo de Infarto agudo de Miocardio (IM).....	70-72
5.5 Niveles de expresión de <i>Walar</i> , <i>Walaa</i> , <i>Walrad</i> , <i>Wallrd</i> y <i>Walras</i> en líneas celulares establecidas.....	72-73
5.6 Análisis mediante hibridación <i>in situ</i> en cortes histológicos de corazón de ratón E14,5 de la expresión de <i>Walras</i>	73-74
5.7 Modulación de la vía UPR en el modelo LmnaCRE.....	74-75
5.8 Efectos de la inducción de estrés del retículo endoplasmático (ERS) en los niveles de <i>Walras</i>	75-76
5.9 Papel de <i>Walras</i> en la vía UPR.....	76-84
5.10 Análisis mediante espectrofotometría de masas de <i>Walras</i>	84-87
5.11 Análisis mediante espectrofotometría de masas de los homólogos humanos de <i>Walras</i> <i>LINC02761</i> y <i>AP002340.1</i>	87-89
5.12 Estudio comparativo de las interacciones con proteínas de <i>Walras</i> , <i>LINC02761</i> y <i>AP002340.1</i>	89-92
5.13 Papel funcional de los homólogos humanos de <i>Walras</i> <i>LINC02761</i> y <i>AP002340.1</i> en la señalización de la vía UPR.....	92-97
6. <u>Discusión</u>	98-108
7. <u>Conclusiones/Conclusions</u>	109-114
8. <u>Bibliografía</u>	115-130
<u>Anexos</u>	131-148

RESUMEN/ABSTRACT



1. Resumen

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En los últimos años, se ha identificado el estrés del retículo endoplasmático (ERS) y en concreto la vía UPR, como piezas clave en la aparición y progresión de distintas patologías cardíacas. Además, diversos lncRNAs actúan como reguladores de la progresión de distintas patologías cardíacas, a través de la modulación de la vía UPR y la apoptosis ligada a ella.

En este trabajo, hemos identificado la desregulación de cinco lncRNAs, *Walras*, *Walar*, *Wala*, *Wallrd*, *Walrad*, previamente relacionados con la fibrilación atrial (AF), en varios modelos de cardiomiopatía dilatada (DCM) y cardiomiopatía hipertrófica (HCM), observándose además una expresión diferencial entre machos y hembras, e identificando que sus niveles modulados están modulados por β -estradiol.

En concreto, *Walras* posee la capacidad de modular la vía UPR a través de la regulación de la expresión de sus distintos componentes, además de alterar la homeostasis mitocondrial. *Walras* interactúa de forma negativa con caluminina, una proteína anti apoptótica en el contexto del ERS, favoreciendo su degradación en el proteosoma y por tanto facilitando la apoptosis celular.

Finalmente, hemos identificamos la capacidad de dos homólogos humanos de *Walras*, *APO02340.1* y *LINC02761*, de modular a la vía UPR, si bien no se ha identificado ninguna interacción común con proteínas entre *Walras* y sus homólogos humanos. Ambos lncRNA humanos poseen la capacidad de actuar de forma indirecta sobre los niveles de caluminina, identificándose una reducción de la viabilidad celular en el caso de *APO02340.1*.

Abstract

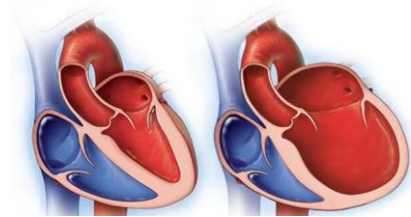
Cardiovascular diseases are one of the main causes of death worldwide. In recent years, endoplasmic reticulum stress (ERS) and specifically the UPR pathway, have been identified as key players in the appearance and progression of different cardiac pathologies. Furthermore, various lncRNAs act as regulators of the progression of different cardiac pathologies, through the modulation of the UPR pathway and its associated apoptosis.

In this work, we have identified the deregulation of five lncRNAs, *Walras*, *Walar*, *Wala*, *Wallrd*, *Walrad*, previously related to atrial fibrillation (AF), in several models of dilated cardiomyopathy (DCM) and hypertrophic cardiomyopathy (HCM), also observing a differential expression between males and females, and identifying that their expression levels are modulated by β -estradiol.

Specifically, *Walras* has the ability to modulate the UPR pathway by regulating the expression of different UPR components, in addition to alter mitochondrial homeostasis. *Walras* negatively interacts with calumin, an anti-apoptotic protein in the context of the ERS, favoring its degradation by the proteasome and therefore facilitating cell apoptosis.

Finally, we have identified the ability of two human homologs of *Walras*, *APO02340.1* and *LINC02761*, of modulating the UPR pathway, although no common interacting proteins have been identified for *Walras* and its human homologues. Importantly, both human lncRNAs have the ability to indirectly modulate calumin levels, leading to a reduction in cell viability in the case of *APO02340.1*.

INTRODUCCIÓN



2. Introducción

2.1. Desarrollo cardiaco

El corazón es el primer órgano que se forma durante el desarrollo embrionario, jugando un papel fundamental durante toda la etapa embrionaria y posteriormente en la vida adulta, debido a su función fundamental en la distribución de oxígeno y nutrientes, además de en la retirada de sustancias de desecho procedente del metabolismo celular.

El corazón de los vertebrados está compuesto por tres capas funcionales bien diferenciadas: 1) Endocardio, conformado por una capa de endotelio en contacto con el flujo sanguíneo, 2) Miocardio, compuesto principalmente por cardiomiocitos acompañados de otros tipos celulares como células estromales, fibroblastos intracardiacos y macrófagos residentes, pudiéndose identificar una capa externa compacta y otra interna con trabéculas, estando irrigado por una rica vasculatura y 3) Epicardio, constituido por una capa externa de mesotelio, estando todo el órgano rodeado por la pared pericárdica (Andrés-Delgado y Mercader., 2016).

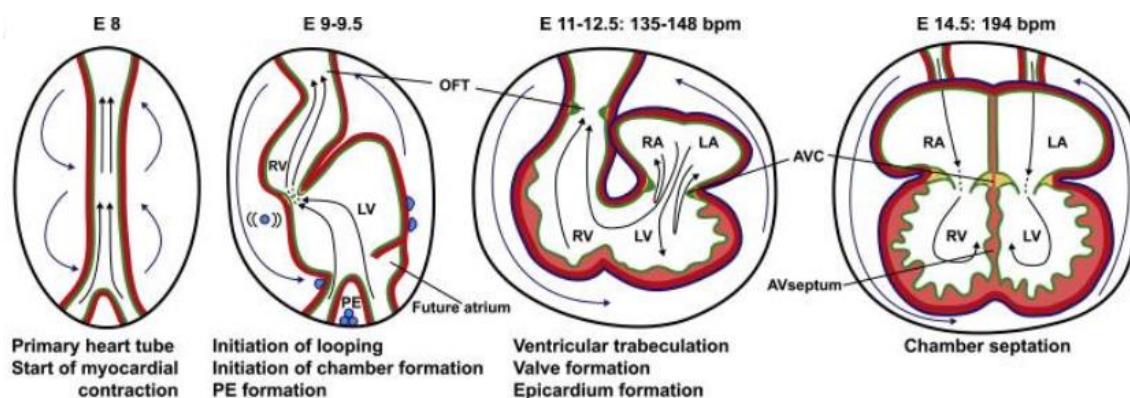


Figura 1. Principales pasos en el desarrollo cardiaco de ratón. E 8: Formación del tubo cardíaco primario e inicio de la contracción cardíaca. E 9-9,5: Inicio de la torsión del tubo cardíaco primitivo y posterior inicio de la formación de las cámaras cardíacas. E11-12,5: Establecimiento de las trabéculas en el miocardio, formación de las válvulas y epicardio. E14,5: Separación de las cámaras (Andrés-Delgado y Mercader., 2016).

La cardiogénesis temprana comienza durante la gastrulación, al inicio de la tercera semana de desarrollo en el caso de los humanos y correspondiendo a un estadio embrionario (E) 7,5 en el desarrollo del ratón. Durante esta etapa el embrión pasa de un estadio bilaminar a un estadio trilaminar, estando compuesto por ectodermo,

mesodermo y endodermo. Concretamente el corazón, empieza su desarrollo a partir de las primeras células mesodérmicas que migran a través del borde anterolateral del disco trilaminar embrionario. Günthel y colaboradores proponen que durante dicha migración las células progenitoras cardíacas adquieren la capacidad de diferenciarse a los diferentes linajes celulares cardíacos (Günthel *et al.*, 2018), quedando éstas restringidas a la zona más interna del mesodermo lateral, conocida como mesodermo esplácnico (Abu-Issa y Kirby.,2007).

Durante la gastrulación, las células progenitoras cardíacas se localizan en las regiones laterales de la línea media del embrión, dando lugar al mesodermo precardiogénico. Posteriormente estas células se fusionarán tras la unión de los bordes del embrión, dando lugar a una estructura conocida como cresta cardíaca. Estas células desarrollan un patrón de expresión génica cardíaco específico, inician el transporte de calcio y poco tiempo después comienzan a latir (Günthel *et al.*, 2018).

En esta etapa del desarrollo cardíaco, la expresión de distintos factores de transcripción específicos permite diferenciar dos zonas de precursores mesodérmicos cardíacos, el campo cardiogénico primario (FHF) y el campo cardiogénico secundario (SHF). Las células derivadas del FHF se fusionan en la línea media dando lugar al tubo cardíaco primario, compuesto de una capa endocárdica separada de una capa miocárdica más interna por una matriz acelular llamada gelatina cardíaca. Una vez formado el tubo cardíaco primario, éste crece debido a la incorporación de células mesodérmicas procedentes del SHF. Estas células migran desde la cavidad pericárdica dorsal y caudal, uniéndose a los extremos venoso y arterial del tubo cardíaco primitivo dando lugar al campo cardíaco secundario posterior (pSHF) y al campo cardíaco secundario anterior (aSHF), respectivamente. En mamíferos, las células del FHF contribuyen principalmente a la formación del ventrículo izquierdo y el canal atrio ventricular, mientras que las células que provienen del SHF contribuyen al desarrollo del ventrículo derecho, el tracto de salida y las aurículas. Estas células provenientes del SHF tienen una alta tasa de proliferación, controlada por la vía de señalización canónica de *Wnt/β-catenina*, perdiendo posteriormente esta capacidad proliferativa a medida que van añadiéndose al tubo cardíaco primitivo (Kwon *et al.*, 2007; Günthel *et al.*, 2018). En un estadio E8,5, el corazón linear sufre una torsión hacia la derecha conocida como

looping cardiaco, coincidiendo con la desaparición del mesodermo dorsal. A continuación, se inicia la diferenciación de las cámaras, teniendo el atrio inicialmente una localización caudal respecto a los ventrículos, ocupando finalmente una posición craneal respecto a ellos. En estadio E9,5, se forma el tracto de salida y los cojines auriculoventriculares, los cuales en un inicio impiden el movimiento retrogrado de la sangre y posteriormente contribuyen al proceso de septación. Es necesario hacer referencia a la contribución no mesodérmica al proceso del desarrollo cardiaco, siendo esta llevada a cabo por parte de una subpoblación de células procedentes de la cresta neural, denominadas células de la cresta neural cardiaca. Esta subpoblación participa en la formación del septo aórtico-pulmonar, además de contribuir a la túnica media de las grandes arterias y la musculatura lisa de los vasos coronarios (Abu-Issa., 2014). En estadio E10,5 las células de la cresta neural cardiaca migrarán hasta los cojines de salida distales donde formarán el septo aórtico-pulmonar, finalizado la septación en cuatro cámaras en el estadio E14,5, continuando la remodelación de los cojines y del tracto de salida hasta etapas postnatales (Evans *et al.*, 2010).

2.2 Regulación molecular del desarrollo cardiaco

Dada la complejidad del desarrollo cardiaco, todos los procesos implicados en él deben encontrarse estrechamente regulados tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional. A nivel transcripcional actúan de manera coordinada distintos efectores moleculares como los factores de crecimiento y factores de transcripción entre otros, mientras que a nivel post-transcripcional juegan un papel clave distintas moléculas de ARN no codificantes, entre las que destacan los microRNAs (miRNA), los ARNs circulares (circRNAs) y los ARN no codificantes de cadena larga (lncRNAs).

2.2.1 Factores de crecimiento

Durante el desarrollo del corazón, las distintas capas de este órgano mantienen una constante y estrecha comunicación mediante la producción, secreción y recepción de distintos factores autocrinos y paracrinos, regulando los diversos procesos que median tanto la cardiogénesis temprana como la tardía. Esta comunicación, es ejercida en gran parte por los factores de crecimiento, encontrándose entre los más relevantes que participan en el desarrollo cardiaco, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), los

factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y aquellos que participan en la vía de señalización canónica *Wnt/β-catenina*.

Proteínas morfogénicas de hueso (BMP)

Las proteínas morfogénicas de hueso o BMPs son un grupo de proteínas, pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (*TGFβ*), que juegan un papel fundamental en diversos procesos biológicos como la apoptosis, proliferación celular, morfogénesis y la diferenciación de distintos tipos celulares, encontrándose entre ellos los cardiomiocitos (Buijtendijk *et al.*, 2020). En la cardiogénesis destacan dos miembros de esta familia, *Bmp2* y *Bmp4*.

Bmp2 es fundamental para la correcta diferenciación de los precursores cardiogénicos y la transición epitelio-mesénquima de las células mesenquimales necesaria para la formación de los cojines endocárdicos. *Bmp2* modula la diferenciación de los precursores cardiogénicos mediante la inducción de la expresión de los factores de transcripción *Nkx 2.5* y *Gata 4* en dichas células y la inhibición del cluster del *miR-17-92*, actuando este cluster como represor de algunos genes fundamentales para la diferenciación de los progenitores cardiogénicos (Waldo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010).

Bmp4 es crucial para el correcto desarrollo del mesodermo y del tracto de salida, identificándose en ratones deficientes para este factor de crecimiento letalidad embrionaria temprana entre los estadios E6,5-9,5. Esta letalidad es debida a un fallo en la proliferación y diferenciación de las células mesodérmicas (Winnier *et al.*, 1995). De forma similar, un modelo distinto de ratón deficiente para este factor presenta deficiencia en el desarrollo de los cojines endocárdicos y de la septación cardiaca, a consecuencia de la desregulación de la proliferación de las células que componen estas estructuras (Garside *et al.*, 2013). *Bmp4* es fundamental para el correcto desarrollo del tracto de salida, quedando evidenciado por los modelos deficientes de ratón para este factor de crecimiento. En ratones en los cuales se ha realizado la delección selectiva de *Bmp4* en los cardiomiocitos del tracto de salida, desarrollan doble salida del ventrículo derecho a causa de la falta de desarrollo del septo interventricular y el canal atrio-ventricular (Jiao *et al.*, 2003).

Factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs)

Los factores de crecimiento fibroblásticos o FGFs comprenden una familia de 22 proteínas de señalización, actuando la mayoría de forma paracrina o endocrina en distintos procesos biológicos (Itoh *et al.*, 2016), destacando en el desarrollo cardiaco el papel que realizan *Fgf8* y *Fgf10*.

Fgf8, es requerido durante la gastrulación, siendo necesario posteriormente para el establecimiento del eje derecho e izquierdo, el *looping* cardiaco (Ilagan *et al.*, 2006) y la supervivencia de las células de la cresta neural durante su migración. Su pérdida produce defectos en la torsión cardiaca, la formación del tracto de salida y el desarrollo del campo cardiogénico anterior, además de una mayor muerte de las células de la cresta neural cardiaca durante su migración (Abu-Issa *et al.*, 2002).

Otro componente relevante de este grupo es *Fgf10*. Este factor de crecimiento se ha identificado como un marcador endógeno del campo cardiogénico secundario, debido a que su expresión se encuentra restringida a los progenitores de dicho campo cardiaco. *Fgf10* actúa como regulador clave en el desarrollo del SHF, debido a su función, en estadios posteriores a E 10.5, en la regulación de la proliferación de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo (Hubert *et al.*, 2018). Ratones mutantes nulos para *Fgf10* no son viables tras el nacimiento, presentando una proliferación alterada de los cardiomiocitos y dando por tanto lugar a una morfología ventricular anómala. Estos hallazgos demuestran el papel clave de este factor de crecimiento en la proliferación de los progenitores cardiacos (Watanabe *et al.*, 2010).

Vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina

La vía de señalización de Wnt es una cascada de señalización intracelular, activada por la secreción de proteínas modificadas con lípidos de la familia Wnt, las cuales se unen a receptores en la superficie de la célula receptora, activando de esta manera la transducción intracelular de señales. La activación de esta vía produce distintas respuestas celulares, como la actividad mitótica, la especificación del tipo celular o de la polaridad de la célula, actuando estas respuestas de forma fundamental en el desarrollo, y en el mantenimiento de la homeostasis en el adulto (Rim *et al.*, 2022).

La vía de señalización Wnt puede dividirse en la vía canónica, o vía Wnt/ β -catenina, en la que se produce una reducción en la degradación de β -catenina y el incremento de la expresión de sus genes diana, y la vía no canónica, funcionando mediante mecanismos no dependientes de β -catenina como son la señalización mediante calcio y la activación de pequeñas ATPasas, actuando en esta vía moléculas como *Wnt5a* y *Wnt11* (Zimmerman *et al.*, 2012). En el desarrollo cardiaco actúa principalmente la vía canónica mediante la modulación de distintos procesos.

La vía Wnt/ β -catenina regula el desarrollo cardiaco durante la embriogénesis, incluyendo la diferenciación miocárdica, la especificación del mesodermo cardiaco y la proliferación, ya que la activación de esta vía induce la expansión de las celular progenitoras del mesodermo cardiaco. Por otro lado, su inhibición induce la especificación cardiaca en el mesodermo y promueve la diferenciación de los cardiomiocitos. En la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón, la activación de la vía Wnt/ β -catenina inhibe la diferenciación miocárdica mientras que promueve la diferenciación de los linajes endoteliales y hematopoyéticos. En el mesodermo lateral posterior, la señales de Wnt, provenientes del tubo neural, inducen su diferenciación a mesodermo hemangiogénico, cooperando Wnt y BMPs para su posterior diferenciación a sangre y vasos sanguíneos (Li *et al.*, 2022). En ratón, la eliminación de β -catenina produce letalidad atribuida a defectos en el campo cardiogénico secundario y sus derivados, como son el tracto de salida, el mesodermo faríngeo y la cámara ventricular derecha, e identificándose estas alteraciones como una de las principales causas de enfermedades cardiacas congénitas (Tzahor., 2007)

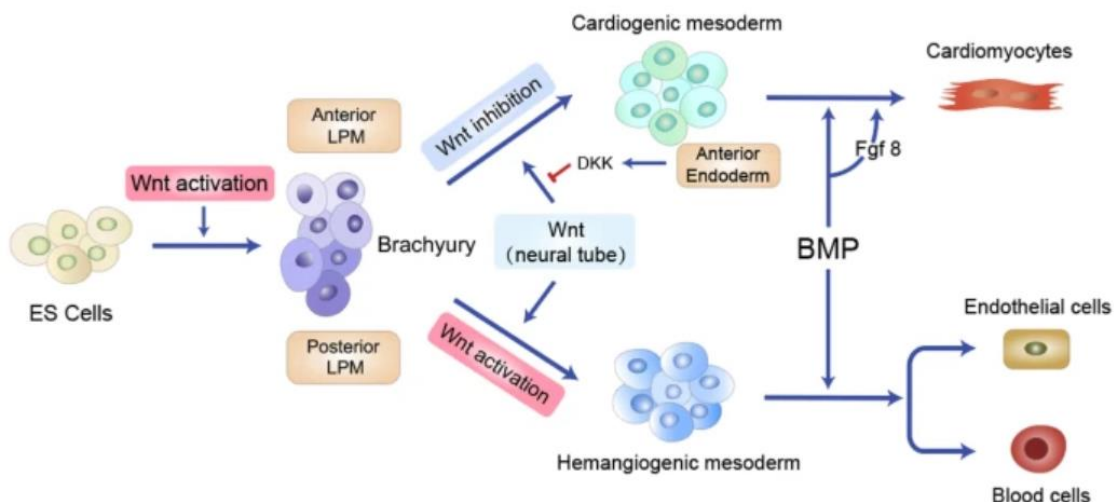


Figura 2. Esquema de la vía Wnt/ β -catenina. Durante la embriogénesis temprana la activación de esta vía induce la especificación del mesodermo desde un estado de célula madre embrionaria (ES). En el mesodermo anterior el inhibidor de Wnt Dkk, secretado por el endodermo, actúa convirtiéndolo en mesodermo cardiogénico. En el mesodermo posterior las señales de Wnt producidas por el tubo neural inducen la transformación de este a mesodermo hemangiogénico (Li et al., 2022)

2.2.2 Factores de transcripción

Durante el desarrollo cardiaco, la transcripción de numerosos genes se encuentra estrechamente regulada por una serie de factores de transcripción, siendo los principales *Mesp1* y *2*, *Gata 4*, *Nkx 2.5*, *Mef2c*, *Srf*, varios componentes de la familia *T-box* y *Pitx2c*.

El factor de transcripción *Mesp1* es el principal activador de la cascada de señalización cardiaca que induce la especificación y diferenciación del mesodermo precardiogénico. La expresión de *Mesp1* es detectada por primera vez en el E6,25 en el mesodermo naciente, que posteriormente se introducirá al final de la línea primitiva y dará lugar a los distintos tipos de linajes cardiacos. La importancia de este factor de transcripción quedó constatada en modelos deficientes para *Mesp1*, los cuales exhiben letalidad embrionaria en E9,5, debido a la falta de desarrollo cardiaco como consecuencia de un defecto de la migración de las células del mesodermo hacia la línea primitiva (Liu, 2017). *Mesp2* es un homólogo de *Mesp1*, el cual en comparación se encuentra en menor nivel en las mismas regiones en las que se expresa *Mesp1*, siendo su principal lugar de expresión el mesodermo presomítico. *Mesp2* puede realizar un papel compensatorio en la diferenciación de los precursores cardiacos, cuando los niveles de *Mesp1* se encuentran alterados, como se observó en estudios de ganancia de función condicional en células madre embrionarias de ratón (Bondue y Blanpain, 2010; Chiapparo et al., 2016).

Nkx2.5 es un factor de transcripción fundamental en el desarrollo del corazón, debido a su papel clave en la regulación de la torsión cardíaca y el posterior desarrollo de las cámaras del corazón. Este factor de transcripción se encuentra expresado en el FHF y SHF (Zhang et al., 2014). Modelos mutantes de ratón deficientes de *Nkx2.5* presentan tubos cardiacos primitivos incapaces realizar la torsión del tubo cardiaco, desarrollando corazones lineales bulbosos, con tractos de salida anchos, ausencia de

desarrollo de cámaras cardíacas diferenciadas y superposición de las estructuras ventriculares y del tracto de salida (Lyons *et al.*, 1995). Distintos modelos de deficiencia de *Nkx2.5* en ratón, mostraron una falta de desarrollo de los ventrículos, relacionándose con bajos niveles de *Hand1*, un factor de transcripción crucial en la regulación del equilibrio entre la diferenciación y proliferación de los cardiomiocitos (Biben y Harvey., 1997; Risebro *et al.*, 2006), asociándose la deficiencia de este factor de transcripción con letalidad embrionaria entre los estadios de desarrollo E9,5 y E10,5. En humano, se ha relacionado la insuficiencia de este gen, debida a la presencia de una sola copia, con el desarrollo de defectos cardíacos congénitos incluyendo defectos en el septo interatrial, doble salida en el ventrículo derecho y tetralogía de Fallot (Zhang *et al.*, 2014).

Gata4 es fundamental para la migración de las células del mesodermo precardiogénico, el desarrollo y torsión del tubo cardíaco primitivo y el desarrollo de algunas estructuras cardíacas. Este factor de transcripción se encuentra expresado en los tejidos cardíacos, derivados del endodermo (Peterkin *et al.*, 2005) y en el mesodermo precardiaco a estadio E7- E7,5. Su expresión se mantiene durante la migración de las células del mesodermo precardiogénico y la formación, torsión y desarrollo del tubo cardíaco primitivo (Brewer y Pizzey, 2006). Distintos modelos mutantes para este factor de transcripción confirmaron su papel fundamental durante el desarrollo cardíaco. Ratones mutantes nulos presentaban corazones hipoplásicos, con una falta de desarrollo de los cojines endocárdicos y proepicardio, y un miocardio delgado, presentado mortalidad embrionaria temprana a estadios E9,5-10 (Watt *et al.*, 2004). Análisis de ganancia de función en ratones, mostraron un corazón hipoplásico, con alteración de la septación del corazón y desarrollo de las válvulas cardíacas y bajo desarrollo del miocardio, observándose en algunos casos doble tracto de salida y canal atrio-ventricular común, provocando estas alteraciones letalidad embrionaria a estadio E12,5 (Crispino *et al.*, 2001). Sugiriendo ambos modelos el papel dosis dependiente de este factor de transcripción.

Mef2c es un factor clave en el desarrollo cardiovascular al regular la torsión cardíaca y el desarrollo del ventrículo izquierdo, además de inducir la expresión de las proteínas estructurales sarcoméricas. Este factor de transcripción se expresa en los progenitores celulares del corazón, dentro del primordio cardíaco, siendo detectable en

estadio E7,5. Ratones deficientes para *Mef2c* presentan defectos graves en el corazón debidos a la falta de torsión del tubo cardiaco primario, la consiguiente falta de formación del ventrículo derecho y la ausencia de expresión de distintos genes de la musculatura cardiaca, como el factor natriurético atrial (*ANF*), α -actina y la cadena pesada de α -miosina, teniendo como resultado letalidad embrionaria entre E 9,5 y E10,5 (Materna *et al.*, 2019).

Miembros de la familia del T-box (*Tbx*) de factores de transcripción actúan como reguladores durante el desarrollo cardiaco estando implicados también en distintos síndromes genéticos y malformaciones cardiacas en humanos, siendo el primero descubierto el gen T-box o *Brachyury*. En conjunto, algunos de los genes que componen esta familia juegan importantes papeles en la determinación de la estirpe celular cardiaca, establecimientos de las cámaras, formación de las válvulas, desarrollo del epicardio y especificación del sistema de conducción (Herrmann *et al.*, 1990; Plageman y Yutzey *et al.*; 2005). La distribución de los distintos factores de transcripción de esta familia implicados en el desarrollo cardiaco es muy heterogénea ya que *Tbx1* se encuentra limitado al polo arterial con una contribución mínima a los componentes del miocardio en desarrollo, pero siendo esencial para la formación del arco aórtico y su remodelación. *Tbx2* se encuentra en el tracto de salida o los canales atrio ventriculares, teniendo un patrón similar a *Tbx3*. *Tbx5* se encuentra sistémicamente en el ventrículo además de en ambas cámaras atriales y *Tbx18* se encuentra solo en un subconjunto concreto de cardiomiocitos del ventrículo y en el polo venoso del corazón. Estas distribuciones muestran la complejidad de la regulación transcripcional llevada a cabo por esta familia de factores de transcripción durante el desarrollo cardiovascular (Franco *et al.*; 2014). La importancia de estos factores de transcripción se puede observar en el caso de *Tbx5*, ya que ratones nulos mueren a E10.5, debido a alteraciones en la torsión cardíaca y fallos en la formación de las aurículas, además de presentar una falta de desarrollo del ventrículo izquierdo (Bruneau *et al.*, 2001). Ratones deficientes para *Tbx2* muestran letalidad a E14,5 a causa de alteraciones en el canal auriculoventricular, retraso en el crecimiento de los cojines endocárdicos y defectos en la septación del tracto de salida (Harrelson *et al.*, 2004).

El factor de respuesta al suero (*Srf*) es un factor de transcripción que regula el desarrollo cardiaco en etapa embrionaria y adulta, mediante la regulación del crecimiento y homeóstasis celular, la regulación de su ciclo celular, apoptosis y diferenciación. *Srf* media la interacción con numerosas moléculas encontrándose entre ellas *Nkx2.5* y *Gata4* y estando ampliamente expresado en distintos tipos celulares (Deshpand *et al.*, 2022). Ratones nulos para *Srf* presentan corazones tubulares no contráctiles a E8, con falta de la porción anterior del tracto de salida, falta de expresión de α -actina cardiaca y de musculo liso. A E8,5 se identifica una dilatación ventricular marcada, una retención del ventrículo derecho y tracto de salida en una región más craneal (Niu *et al.*, 2008), presentando letalidad embrionaria entre E9,5 y E12,5 (Arsenian *et al.*, 1998).

El factor de transcripción *Pitx2* se encuentra ampliamente distribuido en diferentes especies, teniendo tres isoformas en ratón, *Pitx2a*, *Pitx2b* y *Pitx2c*, apareciendo en humanos una cuarta isoforma llamada *Pitx2d*. Durante la cardiogénesis, posee una especial relevancia la isoforma *Pitx2c*, debido a su implicación en el correcto desarrollo de las estructuras del lado izquierdo del corazón, además de la modulación del desarrollo de los canales de calcio, responsables en parte del ritmo cardiaco. Es posible determinar la presencia de este factor de transcripción la cresta cardiaca izquierda pero no en la derecha. En el tubo cardiaco, su expresión se encuentra limitada a la zona izquierda, manteniéndose tras la torsión en las estructuras a las que dará lugar, estando presente en E10,5 en el miocardio de la aurícula izquierda, zona ventral de ambos ventrículos, porción lateral izquierda del canal atrio ventricular y la zona izquierda del tracto de salida (Franco y Campione, 2003). Ratones mutantes para *Pitx2c* presentan isomerismo auricular derecho, caracterizado por la similitud en forma y localización de la aurícula izquierda respecto a la derecha, estando comunicadas debido a carecer de septo interatrial, fallos en la elongación y rotación del tracto de salida y alineamiento entre los vasos arteriales y los ventrículos (Mommersteeg *et al.*, 2007a; Mommersteeg *et al.*, 2007b). Lozano y colaboradores indicaron que la deficiencia de *Pitx2c* regula la expresión de *Wnt8*, el cual modula una intrincada cascada de señalización afectando a los canales de calcio, favoreciendo la aparición de alteraciones pro-arritmogénicas (Lozano *et al.*, 2016). Miocitos atriales aislados provenientes de ratones que presentaban

una delección condicional atrial específica de *Pitx2c*, presentan un aumento en los picos de liberación de calcio y el incremento de potenciales de acción espontáneos, identificándose alteraciones similares a las observadas en miocitos del atrio izquierdo de pacientes con fibrilación atrial (Tarifa *et al.*, 2023).

2.3 Regulación post-transcripcional: ARNs no codificantes

Los distintos procesos celulares que median la cardiogénesis se encuentran estrechamente regulados mediante una compleja red, compuesta por distintos factores moleculares y las interacciones entre ellos. En esta red de regulación participan los ARNs no codificantes (ncRNAs), los cuales pueden ejercer su papel a distintos niveles; transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional, siendo sus principales componentes los microARNs (miRNA), ARNs largos no codificantes (lncRNAs) y los RNAs circulares (circRNAs).

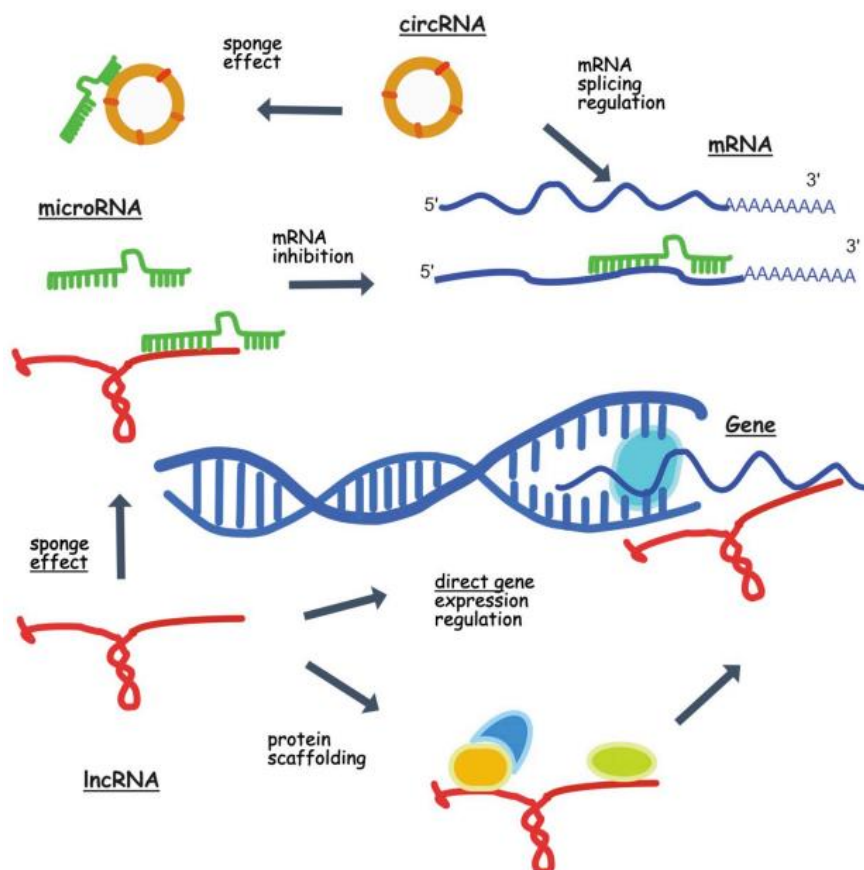


Figura 3. Representación esquemática de la regulación sobre la expresión génica llevada a cabo por microRNAs (Verde), lncRNAs (Rojo) y circRNAs (Naranja). (Panni, S, *et al.*, 2020)

2.3.1 MicroARNs

Los microARNs (miRNA) son una clase de ARN no codificante evolutivamente conservados, de un tamaño comprendido entre 20 y 26 nucleótidos, que regulan de forma negativa la expresión de distintos genes, a nivel post-transcripcional, mediante la alteración de la estabilidad o capacidad de transducción de distintos ARNs mensajeros. Los miRNA se unen a la región 3' no traducida (3'UTR), siendo requerida para este proceso la proteína argonauta (AGO) que actúa como componente fundamental del complejo silenciador inducido por ARN (RISC). Una vez cargados los microARNs en la proteína AGO, estos pueden guiar al complejo RISC hacia un ARNm diana, cuya secuencia es complementaria, induciendo su represión traduccional o su degradación. Los microARNs también poseen la capacidad de unirse a secuencias codificantes y a la región 5'UTR (Nemeth *et al.*, 2024). En los últimos años, varios estudios han mostrado como los microARNs también desempeñan distintas funciones en el núcleo mediante su capacidad de asociarse a la cromatina y la regulación de la transcripción nuclear (Khan., 2021), su capacidad de modular la transcripción de los ARNs no codificantes, regulación epigenética y modulando el *splicing* alternativo (Roberts., 2014), identificándose en varios trabajos que la mayoría de los microARNs presentan una distribución subcelular citoplasmática y nuclear similar (Li *et al.*, 2020).

Hay múltiples ejemplos de la importancia de los microARNs en el desarrollo cardiaco (Nakajima *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2016; Lozano-Velasco *et al.*, 2024), siendo dos de los ejemplos más destacables, miR-1 y miR-133. En el contexto del desarrollo cardiaco, se ha observado como miR-1 y miR-133, de una forma conjunta, promueven el paso de las células madre embrionarias a células mesodérmicas, actuando en etapas posteriores del desarrollo de forma opuesta, debido a que miR-1 favorece la diferenciación a cardiomiocitos y miR-133 inhibe esta dicha diferenciación (Kalayinia *et al.*, 2021). miR-1 comienza a expresarse en estadio E8,5 incrementándose su presencia tras el nacimiento, derivando de dos transcritos, miR-1-1 y miR-1-2, de secuencias idénticas, pero distintos precursores. La eliminación de miR-1-1 o miR-1-2 en ratón produce un fenotipo caracterizado por defectos proliferativos de los cardiomiocitos y alteraciones electrofisiológicas, produciendo la doble carencia de ambos mortalidad embrionaria en estadio E11,5. Su sobreexpresión durante el desarrollo cardiaco produce

una proliferación defectuosa de los miocitos ventriculares y una hipoplasia del sistema cardiaco de conducción ventricular (Benzoni *et al.*, 2021). La familia del miR-133 se encuentra compuesta por miR-133a-1, miR133a-2 y miR-133b (Kalayinia *et al.*, 2021). Ratones que carecen de la isoforma miR-133a-1 o miR133a-2 por separado no presentan alteraciones, en cambio la ausencia de ambos producía alteraciones en la proliferación de los cardiomiocitos, apoptosis y expresión errónea de genes del musculo liso cardiaco, resultando en muerte embrionaria o neonatal. Los ratones mutantes que sobreviven poseen deficiencias en la contractibilidad del corazón muriendo por posteriormente por insuficiencia cardiaca o muerte súbita (Liu *et al.*, 2008). miR-133a es un ejemplo de microARN que también realiza una función nuclear, como se puede observar en el trabajo de Di Mauro y colaboradores en el cual se ha observado que este microARN actúa en como represor transcripcional del gen *de novo* ADN metiltransferasa 3B (Dnmt3b) en cardiomiocitos humanos y de ratón. Dnmt3b forma parte del mecanismo regulador encargado de modular el acceso al ADN de la maquinaria de transcripcional. miR-133a realiza esta función al formar un complejo con la proteína AGO2 induciendo una reorganización epigenética en el promotor del gen Dnmt3b (Di Mauro *et al.*, 2019).

2.3.2 ARNs Circulares (CircRNAs)

Los ARNs circulares comprenden a una gran clase de ARNs no codificantes, producidos por un evento de *splicing* no canónico conocido como *splicing* inverso, en el que un sitio donante de *splicing* aguas abajo se une mediante un enlace covalente a un sitio de *splicing* aceptor aguas arriba. La mayoría de ellos se expresan a partir de genes codificadores de proteínas conocidos, con uno o varios exones (Kristensen *et al.*, 2019), siendo necesaria para su síntesis señales de *splicing* y la maquinaria del proceso canónico de *splicing* (Chen y Yang.,2015)

Este tipo de ARNs son especialmente abundantes en eucariotas, encontrándose evolutivamente conservados y siendo específicos para determinados tipos celulares y estadios de desarrollo. Las regiones que los codifican pueden localizarse tanto dentro como fuera de las regiones codificantes para proteínas, además de presentar tamaños variables. Sus características fundamentales son su extraordinaria estabilidad, ya que carecen de extremos expuestos para su degradación nucleotídica y cierto plegamiento determinado por su estructura. En el contexto del desarrollo cardiaco, un ejemplo es

circNCX1, el cual se encuentra aumentado 4 veces en muestras de corazón de neonatos de rata respecto a muestras de adulto. Estudios de pérdida de función identificaron una reducción en la capacidad de diferenciación y proliferación de los cardiomiocitos, observándose cuando se inducía su sobreexpresión, un aumento de la hipertrofia y apoptosis (Ding *et al.*, 2022).

2.3.3 ARNs largos no codificantes (lncRNAs)

Los genes codificantes para lncRNA componen gran parte del genoma (Mattick *et al.*, 2023). La definición clásica de estas moléculas las describe como transcritos de ARNs no codificantes, de más de 200 nt, con la capacidad de ejercer funciones tanto a nivel nuclear como a nivel citoplasmático, además de en distintos orgánulos, siendo su distribución subcelular un reflejo de dichas funciones. La mayoría de los lncRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II (Pol II), mientras que una pequeña fracción de éstos es sintetizada por la ARN polimerasa III. Los lncRNA transcritos por la Pol II presentan una estructura caracterizada por una caperuza en el extremo 3' y una cola de poli(A) en el extremo 5'. Similar a lo observado en los ARNs mensajeros no maduros, los transcritos de lncRNAs presentan una región génica con exones e intrones. Del mismo modo que estos la mayoría de lncRNAs sufren *splicing* alternativo, dando lugar a varias isoformas, siendo este *splicing* más frecuente en comparación a lo que se puede observar en el ARNm (Bridges *et al.*, 2021).

Los lncRNA se pueden clasificar en función de su posición en el genoma relativa a los genes próximos que codifican proteínas o según sus funciones. En el primer caso, podemos clasificarlos en siete categorías: 1) lncRNA transcritos de manera opuesta, encontrándose su origen en la región promotora de un gene adyacente pero en la cadena opuesta, 2) lncRNA originados de manera convergente en hebras contrarias respecto a la región codificante, 3) lncRNA intergénico (lincRNA) localizado entre genes codificantes, generalmente separado por una distancias de más de 10 kilobases, 4) lncRNA cuya secuencia codificante se encuentra superpuesta con otros genes en la misma hebra o hebra opuesta, 5) ARNs enhancer producto de transcripciones uni- o bidireccionales, 6) lncRNA transcritos a partir del intrón de otro gen, o 7) lncRNA en cuyo interior se encuentra codificado un microARN (Figura 4) (Schmitz *et al.*, 2016).

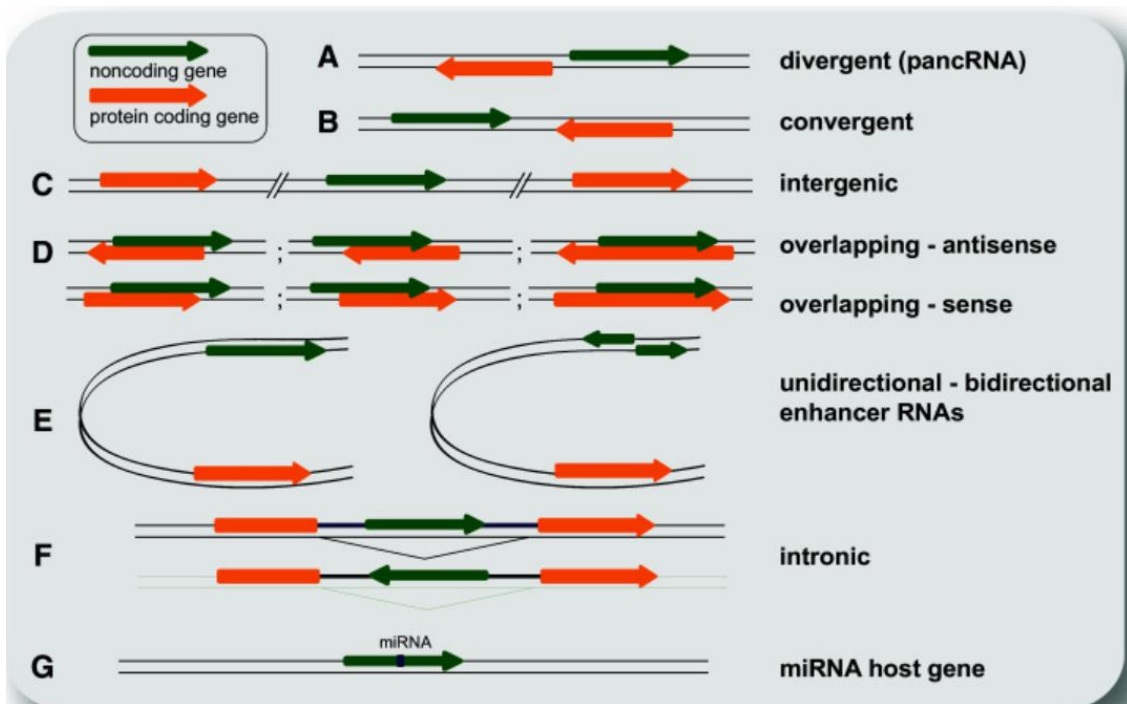


Figura 4. Clasificación de los lncRNA atendiendo a su posición relativa respecto a genes codificantes vecinos (Schmitz *et al.*, 2016).

Atendiendo a su funcionalidad, los lncRNA se pueden dividir en aquellos que realizan su función en *cis*, regulando la expresión de los genes próximos y/o el estado de la cromatina en la que se encuentran, y aquellos que las realizan en *trans*, ejerciendo funciones de regulación en toda la célula. En el primer caso, aquellos que actúan en *cis*, pueden actuar mediante tres vías: 1) la propia transcripción del lncRNA regula la expresión de genes próximos, 2) su proceso de transcripción y/o *splicing* les confiere capacidad para actuar como reguladores génicos de forma independiente de la secuencia del transcrito de ARN, o 3) la regulación ejercida depende de elementos de ADN dentro del promotor del lncRNA o locus del gen próximo. Aquellos que actúan en *trans* lo hacen regulando el estado de la cromatina y la expresión de genes en regiones distantes del sitio de transcripción del lncRNA, influyendo en la estructura nuclear y su organización, o interactuando y regulando la actividad de proteínas o de otros tipos de ARN, como son los microARNs (Kopp y Mendel., 2018).

La distribución subcelular de los lncRNAs se encuentra estrechamente relacionada con sus funciones, siendo los lncRNAs nucleares menos estables que los citoplasmáticos, ya que estos realizan importantes funciones en el núcleo, como la regulación de la expresión de genes mediante la interacción con la cromatina y su

regulación, además de realizar funciones de apoyo estructural al estabilizar el núcleo. Por otro lado, los lncRNA citoplasmáticos desempeñan gran variedad de funciones, entre las que destacan la modulación de transducción de señales, regulación de programas traduccionales, el control postranscripcional de la expresión de genes mediante el secuestro de miRNA, regulando su actividad y presencia, y el control de la estabilidad, modificaciones y traducción del ARNm (Bridges *et al.*, 2021).

En el caso de los lncRNA mitocondriales, se ha determinado que el ADN mitocondrial codifica varios lncRNAs, identificándose entre ellos, tres lncRNAs que regulan la expresión de tres genes de este orgánulo (Li *et al.*; 2023). Estos tres lncRNAs, llamados *lncND5*, *lncCyt b*, y *lncND6*, fueron descritos por primera vez en mitocondrias de células tumorales HeLa. Encontrándose localizados en las regiones complementarias de los genes *ND5*, *ND6* y *Cyt b*, no presentando marcos de lectura abiertos. Estos tres lncRNA actúan estabilizando el ARNm de estos tres genes mediante la formación de dúplex ARN-ARN (Rackham *et al.*; 2011). En el contexto de la patología cardíaca, se ha identificado al lncRNA mitocondrial *LIPCAR* como un buen biomarcador de la remodelación del ventrículo izquierdo tras infarto de miocardio. *LIPCAR* se encuentra aumentado en pacientes que presentaban dicha remodelación, además de estar también elevado en pacientes que presentaban fallo cardíaco crónico, asociándose sus niveles con mayor riesgo de muerte (Kumarswamy *et al.*, 2014).

Un gran número de lncRNAs han sido identificados, principalmente en humano y ratón, los cuales juegan papeles fundamentales en el desarrollo de mamíferos, desde la gametogénesis, pasando por la embriogénesis, el establecimiento del eje corporal, la organogénesis y el desarrollo pre- y postnatal (Saha *et al.*, 2017). Un ejemplo es el caso del desarrollo de la piel, en el que se ha determinado la existencia de los lncRNAs, llamados *ANCR* y *TINCR*, siendo expresados en las células progenitoras epidérmicas, y exhibiendo un papel antagónico entre ellos, favoreciendo *TINCR* la diferenciación y *ANCR* ejerciendo el efecto contrario (Kretz *et al.*, 2012) (Kretz *et al.*, 2013).

En el contexto cardíaco se han hallado en las últimas décadas algunos lncRNA los cuales regulan el desarrollo del corazón en distintas etapas, siendo algunos de ellos *Braveheart*, *Carmen*, *Fendrr*, *Alien*, *H19* y *Hand2os1/Uph*.

El lncRNA *Braveheart (Bvht)*, también conocido como *AK143260*, es un lncRNA necesario para el compromiso de la estirpe cardiovascular, actuando aguas arriba del factor de transcripción *Mesp1*. *Bvht* es necesario para la activación de distintos factores de transcripción cruciales para el desarrollo cardiovascular como *Mesp1*, *Gata4* y *Nkx2.5* entre otros y la transición epitelio-mesénquima, siendo estos *Snail 1* y *Twist* (Klattenhoff *et al.*, 2013). Su delección induce una menor formación de cardiomiocitos con capacidad de contracción, a partir de células madre embrionarias, al ser incapaces estas células de activar algunos de los factores de transcripción clave que regulan la cardiogénesis, encontrándose una desregulación de 548 genes en estas células madre embrionarias (Kataoka *et al.*, 2014). En estudios de ganancia de función de este lncRNA en células madre mesenquimales de ratón, se identificó un incremento de los factores de transcripción *Gata 4/6*, *Mesp1*, *Nkx2.5*, acompañado de una mayor presencia de genes asociados a transición epitelio-mesénquima (EMT) como *Snai1*, *Twist* y *N-cadherina*, observándose en el mismo estudio que estos incrementos se vía revertido cuando se inhibía a *Mesp1* (Hou *et al.*, 2017).

La expresión de *Bvht* se encuentra modulada por otro lncRNA llamado *CARMEN*, el cual fue descubierto en células precursoras cardíacas en humano, en las que se observó la expresión diferencial de 570 lncRNA durante el desarrollo cardíaco, encontrándose muchos de ellos en regiones potenciadoras activas durante este proceso (Ounzain *et al.*, 2015)

CARMEN es un lncRNA específico cardíaco, expresado en corazones fetales y adultos y conservado entre los mamíferos. Este lncRNA modula la cascada de señalización de la especificación y diferenciación del mesodermo precardiogénico, mediante la regulación de la expresión de los genes que la forman. *CARMEN* regula la expresión de genes cruciales pluripotenciales, tales como *Nanog* y *Sox2*, desempeñando por ello un papel clave durante el desarrollo del corazón al modular la diferenciación y especificación del mesodermo cardiogénico y la pluripotencialidad celular. Además, *CARMEN* interacciona en *trans* con dos subunidades del complejo represor polycomb2 (*PRC2*), siendo estas *SUZ12* y *EZH2*, el cual introduce una metilación en la lisina 27 de la histona H3, actuando esta metilación como marca represora en el genoma, siendo esta

necesaria para la diferenciación cardiaca. *CARMEN* es fundamental para la homeostasis de los cardiomiocitos y su destino celular (Ounzain *et al.*, 2015)

El ARN no codificante regulador del desarrollo adyacente a *FOFX1* (*Fendrr*) realiza un papel fundamental en el control de la expresión genética en mamíferos, siendo transcrito en dirección opuesta respecto al gen vecino *FOFX1*, compartiendo una región en la que se localizan promotores (Szafranski y Stankiewicz., 2021). Este lncRNA se expresa en el extremo caudal del mesodermo lateral, la zona que dará lugar al corazón y las paredes corporales, localizándose preferentemente en el núcleo celular. Ratones mutantes nulos para *Fendrr* presentaban mortalidad embrionaria a estadio E13,75, debida a alteraciones estructurales en el corazón, presentando acumulación de sangre en la cámara cardiaca derecha. Curiosamente, la ganancia de función en ratón producía hipoplasia del miocardio, afectando a las paredes ventriculares y al septo interventricular (Grote *et al.*, 2013).

Alien, el cual tiene una localización perinuclear y citosólica en las células progenitoras cardiacas en humano, presenta una correlación en su expresión con distintas proteínas fundamentales para la formación del mesodermo y el compromiso cardiovascular como son *Brachyury*, *EOMES*, *MixL1* y *Gata 4*. En ratón, la expresión de *Alien* se encuentra localizada en el alantoides y en la placa lateral mesodérmica en estadio E8,5, relacionándose su expresión, al igual que en humano, con la presencia de *Brachyury* y *MixL1*. Ratones mutantes deficientes en este lncRNA mostraron alteraciones en la formación de las cámaras cardiacas y en la formación de los vasos sanguíneos (Kurian *et al.*, 2015).

H19 se encuentra aumentado en etapas avanzadas de desarrollo cardiaco, identificándose un incremento excesivo del corazón en ratones deficientes para este lncRNA y un tamaño disminuido de este órgano a nivel post natal en aquellos ratones en los que se encuentra sobre expresado. Estas alteraciones pueden ser explicadas mediante el papel supresor que realiza *H19* sobre miR-19, el cual tiene como diana *Sox6*, inhibiendo de esta manera la proliferación celular, facilitando la apoptosis en etapas avanzadas de la diferenciación cardiaca (Wang *et al.*, 2022).

El lncRNA *Hand2os1/Uph* actúa como modulador de la expresión del gen vecino *Hand2*, siendo este un gen fundamental en la formación del corazón, y por ello en el desarrollo cardiaco. Estudios de pérdida de función en ratón para este lncRNA mostraron un incremento en los niveles de *Hand2* en las células cardíacas, observándose defecto en la formación del septo interventricular, hipoplasia del ventrículo derecho con un miocardio compacto más delgado, y un descenso en el volumen de la cámara cardíaca pudiendo producir letalidad embrionaria o perinatal (Han *et al.*; 2019).

2.4 Enfermedades cardíacas

El desarrollo cardiovascular es un proceso de gran complejidad que se encuentra regulado por un gran número de moléculas, desde factores de crecimiento y transcripción, hasta ARNs no codificantes, las cuales interactúan entre ellas y sus respectivos genes diana. El objetivo de estas interacciones es conseguir asegurar la correcta diferenciación, especificación y maduración de los progenitores cardíacos y de todas las células que componen a el corazón, formando un corazón funcional capaz de cumplir con los requerimientos del organismo. Las alteraciones en las distintas moléculas involucradas en el correcto desarrollo cardiaco, y su posterior función, pueden producir o regular la progresión de distintas patologías cardiovasculares. La aparición de estas patologías puede ser producida por eventos congénitos, como la alteración en los factores de transcripción *Nkx2.5* o *Gata 4* (Sun *et al.*, 2015), teniendo consecuencias en el desarrollo embrionario del corazón. También, puede ser debidas a procesos cardíacos patológicos agudos, como el infarto agudo de miocardio, el cual es causado por una reducción brusca del riego sanguíneo al miocardio (Boateng y Sanborn., 2013), o procesos crónicos, como la cardiomiopatía dilatada, caracterizada por una alteración en la estructura del ventrículo izquierdo a causa de una remodelación mantenida en el tiempo (Harding *et al.*, 2023).

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) son definidas como desórdenes en el corazón o sistema circulatorio, comprendiendo un grupo heterogéneo de patologías, siendo consideradas la causa principal de muerte prematura a nivel mundial durante los últimos años. Dentro de las patologías cardíacas podemos distinguir patologías congénitas, siendo estas definidas como grupo de alteraciones estructurales o defectos en el corazón en el momento del nacimiento, produciéndose estas alteraciones durante

el desarrollo fetal pudiéndose encontrar afectadas las cámaras, válvulas, paredes y vasos sanguíneos del corazón. Estas patologías congénitas pueden aparecer como anomalías menores que no afectan a la calidad de vida, o severas, encontrándose globalmente presentes en el 1% de los nacidos vivos (Sessa *et al.*,2024). Por otro lado, podemos encontrar patologías cardíacas adquiridas, cuya aparición es posterior al nacimiento pudiéndose dividir en patologías arritmogénicas, en las que se produce una alteración en las propiedades electrofisiológicas de las células cardíacas y los mecanismos iónicos subyacentes (András *et al.*, 2021), o estructurales, en las que se produce una alteración en la forma o tamaño de alguno de los componentes del corazón, encontrándose frecuentemente relacionada la aparición de alteraciones estructurales con alteraciones electrofisiológicas (Soares *et al.*,2017).

Las enfermedades cardiovasculares están causadas distintos factores, siendo algunos invariables, como la edad, el sexo o la herencia genética, y siendo otros variables como el consumo de tabaco, la falta de actividad física o la mala alimentación. Se estima que 23.6 millones de personas morirán al año por CVD para el año 2030, teniendo en cuenta la existencia de una leve tendencia en la reducción de dicha mortalidad e incidencia en el noroeste y sur de Europa. Las enfermedades cardiovasculares causan el 49% de la mortalidad a nivel europeo, siendo la principal causa de muerte prematura y de minusvalía ajustada a los años de vida, creando un importante problema en la salud pública (Francula-Zaninovic y Nola., 2018). Algunos ejemplos de enfermedades cardíacas adquiridas pueden ser el infarto de miocardio, la cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada, siendo estas estructurales o fibrilación atrial, siendo en este caso arritmogénica.

2.4.1 Infarto de miocardio (MI)

El infarto de miocardio se define como la necrosis del miocardio debida a isquemia prolongada de este tejido (Dahhan., 2019). Los factores de riesgo para esta patología se pueden dividir en factores de riesgo no modificables (edad, sexo o historial médico), factores de riesgo modificables (fumar, consumo de alcohol, inactividad física, dieta pobre, hipertensión, diabetes, dislipemia o síndrome metabólico) y un tercer grupo de factores de riesgo emergentes (calcificación de la arteria coronaria, o los niveles de

Proteína C reactiva, fibrinógeno, homocisteína, lipoproteína A y lipoproteína de baja densidad) (Boateng y Sanborn., 2013).

Esta patología presenta una tasa de mortalidad del 17 por ciento anualmente y constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Tirdea *et al.*, 2022) La patofisiología de esta enfermedad depende de una gran variedad de procesos biológicos incluyendo el metabolismo de los lípidos y la aterosclerosis, activación plaquetaria, cascada de coagulación, angiogénesis y la inflamación y disfunción endotelial. En los últimos años se han establecido una serie de genes, relacionados con los procesos que afectan al MI, que influyen en la aparición de esta patología, como por ejemplo el gen LDLR encargado de la eliminación de LDL de la circulación o APO-A5 cuya función es inducir una regulación al alza de la presencia de la lipoproteína lipasa, siendo estos dos genes relacionados con el metabolismo de los lípidos, o el gen PAI-1, encargado de la inhibición de la activación del plasminógeno tisular, formando parte de la cascada de coagulación, el gen CDKN1A , cuya función en la regulación de la proliferación de las células del musculo liso vascular influye en la función endotelial (Khawaja *et al.*, 2023). La muerte de los cardiomiocitos durante IM se encuentra causada por la necrosis y apoptosis de los mismos, caracterizándose la necrosis por ser un proceso pasivo, sin encontrarse regulado y caracterizado por la hinchazón celular, la pérdida de la integridad de membrana celular y una intensa liberación de factores de daño celular que darán lugar a una intensa inflamación en la zona afectada. Por otro lado, la apoptosis es un proceso programado, caracterizado por la contracción celular, la producción de cuerpos apoptóticos que serán eliminados por fagocitos profesionales, produciendo una eliminación limpia de las células muertas sin inducción de inflamación. En las condiciones patológicas, como las que se dan durante el infarto de miocardio, se producen de forma simultánea ambos tipos de eventos, encontrándose ambos tipos de muerte celulares relacionadas con la muerte de cardiomiocitos tras el infarto de miocardio, siendo posible identificar gran cantidad de cardiomiocitos necróticos y apoptóticos en el tejido afectado, muriendo la mayoría de los cardiomiocitos afectados 24 horas después del evento cardíaco (Frangogiannis., 2011).

2.4.2 Cardiomiopatía Hipertrófica

La cardiomiopatía hipertrófica es una enfermedad cardiovascular hereditaria común, presente en una de cada 500 habitantes de la población en general, y asociadas a más de 1400 mutaciones en más de 11 genes que codifican proteínas del sarcómero cardiaco. Esta patología es la causa más frecuente de muerte súbita en jóvenes, pudiendo causar discapacidad funcional debido a insuficiencia cardiaca o accidente cerebrovascular, siendo necesario destacar que la mayoría de las personas que la padecen no son diagnosticadas y muchos de ellos no presentan reducciones marcadas en su esperanza de vida o síntomas evidentes (Maron y Maron., 2013). Su fenotipo se encuentra caracterizado por hipertrofia del ventrículo izquierdo, hipercontractibilidad miocárdica, reducción en la capacidad de distensión cardiaca, desorden miofibrilar y fibrosis (Tuohy *et al.*, 2020). Las alteraciones en los genes *MYH7* y *MYBPC3* son los dos factores más frecuentes en la aparición de esta patología, siendo las responsables de más del 50 % de los casos de cardiomiopatía hipertrófica que presentan variantes patogénicas. Otros genes que presentan variantes deletéreas son por ejemplo el gen que codifica a la troponina T cardiaca (*TNNT2*), el gen que codifica la troponina cardiaca I (*TNNI3*), o el que codifica para la α - tropomiosina (*TPM1*) (Glavaški *et al.*, 2023).

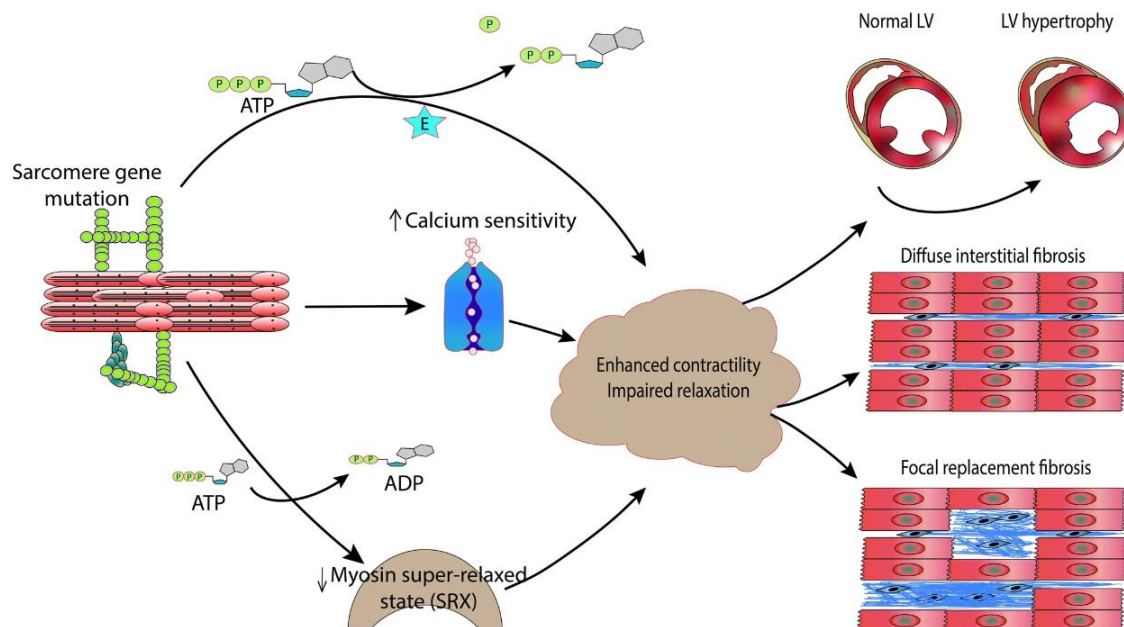


Figura 5. Características fenotípicas de la cardiomiopatía hipertrófica. El aumento de la actividad ATP-asa y a la sensibilidad al calcio conduce una actividad normal o a una hipercontractibilidad con la consiguiente disfunción diastólica (Muresan y Agoston-Coldea., 2021)

En algunos casos pueden aparecer anomalías de la válvula mitral y subvalvulares, además de puentes miocárdicos, pudiendo sugerir estas alteraciones una afectación del correcto desarrollo del corazón. Olivotto y colaboradores plantearon una posible hipótesis para la aparición de estas alteraciones, consistiendo dicha hipótesis en la alteración de la migración de las células derivadas del proepicardio hacia el miocardio del corazón primitivo. Estas células darán lugar a los fibroblastos intersticiales, que formarán el andamiaje cardíaco, la vasculatura coronaria, y a los cojines auriculoventriculares, por ello, la modificación de su migración y sus procesos de diferenciación pueden provocar alteraciones en el desarrollo cardíaco, como las previamente mencionadas (Olivotto *et al.*; 2009).

2.4.3 Cardiomiopatía dilatada (DCM)

La cardiomiopatía dilatada es patología definida por la dilatación o disfunción sistólica biventricular o del ventrículo izquierdo, en ausencia de condiciones anormales de carga sanguínea como puede ser una enfermedad primaria de las válvulas cardíacas, o una enfermedad de las arterias coronarias suficiente, para generar una remodelación ventricular. Las causas de esta patología incluyen aquellas de componente genético, cardiomiopatía dilatada primaria, y las debidas a factores adquiridos, consideradas cardiomiopatía dilatada secundaria, considerándose como factores adquiridos las infecciones, toxinas, tratamiento frente a el cáncer, endocrinopatías, embarazo, arritmia/taquicardias o enfermedades de base inmunológica (Heymans *et al.*, 2023).

Comúnmente el inicio de esta patología ocurre entre la tercera y cuarta década de vida, con un predominio de aparición en los hombres con un promedio de 3:1 respecto a las mujeres. En el momento del diagnóstico, los pacientes presentan alteraciones cardíacas graves como son remodelación en ambos ventrículos y disfunción contráctil grave, reflejando estos sucesos una progresión asintomática mantenida en el tiempo (Merlo *et al.*, 2018). En el 35 % de los casos los pacientes presentan mutaciones genéticas en genes que codifican proteínas del citoesqueleto, del sarcómero o de envoltura nuclear, entre otros (Weintraub *et al.*, 2017)

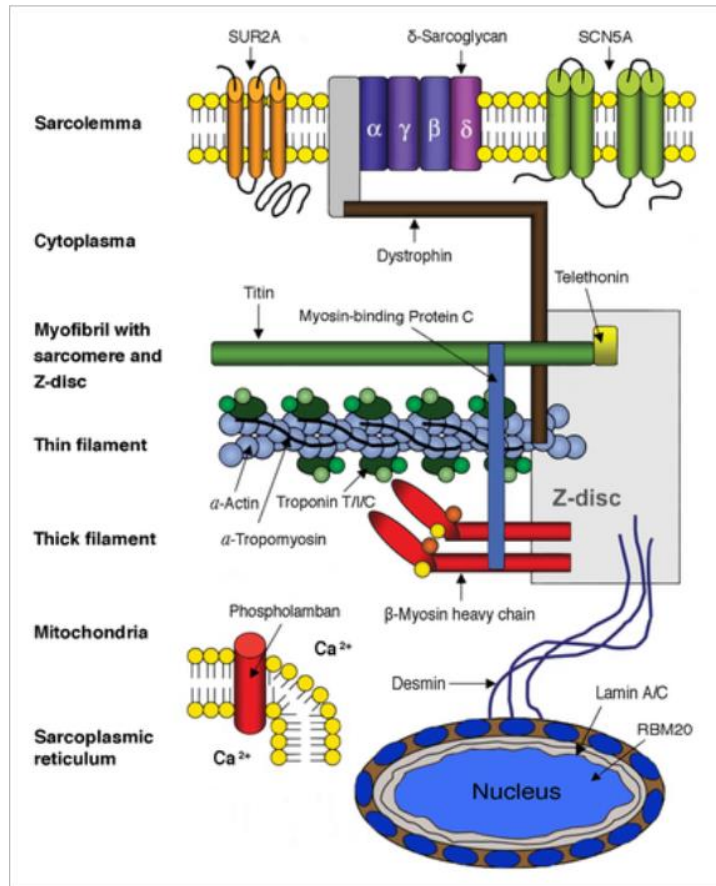


Figura 6. Causas genéticas de la cardiomiopatía dilatada. Es necesario destacar las distintas causas de la cardiomiopatía dilatada en función de su distribución dentro de la célula, afectando a proteínas involucradas en el sarcómero y sus componentes, además de su relación con distintos orgánulos celulares, como son las mitocondrias o el retículo endoplasmático, y el núcleo (Reichart *et al.*, 2019).

Hasta un 25 % de las personas que padecen DCM presentan mutaciones en el gen de la titina (*TTN*), con una prevalencia mayor en pacientes de más de 40 años. Esta proteína forma una cadena polipeptídica, que conecta los filamentos de actina y miosina de forma firme y elástica, teniendo su extremo amino terminal anclado al disco Z del sarcómero representando el principal elemento estructural de los sarcómeros y estando sometida a distintas cascadas de regulación de la función muscular. La mayoría de las mutaciones del gen de la *TTN* se encuentran en la región fundamental para la función de andamiaje biomolecular y de interacción proteica de la *TTN*, provocando la mayoría de las variantes patógenas la producción de la proteína truncada (Reichart *et al.*, 2019).

El 5 % de los casos de DCM son debidos a alteraciones en el gene de la Lamina (*LMNA*), un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 1, que codifica para las laminas A y C, dos isoformas producidas mediante *splicing* alternativo. Estas proteínas

son filamentos intermedios de entre 67 y 70 kilo Dalton, que se ensamblan entre ellas dando lugar a heterodímeros y tetradímeros que estabilizan la lámina nuclear interna, además de actuar como puntos de anclaje para la cromatina nuclear. Mutaciones en el gen que codifica a estas proteínas puede dar lugar a proteínas truncadas o con su estructura de alfa-hélice alterada, siendo ambas alteraciones incompatibles con su multidimerización y su actividad como estabilizadoras de la lámina nuclear interna (Reichart *et al.*, 2019).

Al-Yacoub y colaboradores informaron que una mutación en el gen *FBX032* causaba cardiomiopatía dilatada mediante una activación no canónica de *CHOP*. Observaron que en explantes de corazón de pacientes con esta patología se observaba una expresión aumentada de distintos marcadores de estrés del retículo como *ATF6*, *BIP/GRP78* o *XBP1* respecto a los controles, mostrando esto el establecimiento del estrés de RE y la activación de la vía UPR en estos pacientes (Al-Yacoub *et al.*, 2021).

Un factor a tener en cuenta en esta patología es la desregulación energética que ocurre en el miocardio afectado, agravándose esta situación por la dilatación de la cámaras, la tensión elevada de las paredes cardiacas y la fibrosis intersticial, por ello en el corazón afectado se observa una disfunción mitocondrial, caracterizada por la reducción de la β -oxidación de los ácidos grasos o el catabolismo de aminoácidos, la activación de la glucólisis, generación excesiva de especies reactivas de oxígeno y de señales mitocondriales de muerte. Sin embargo, las anomalías mitocondriales podrían también actuar como agentes causales de la cardiomiopatía dilatada (Wu *et al.*, 2021).

Atendiendo a la posible relación entre la alteración mitocondrial y la cardiomiopatía dilatada, es necesario estudiar la relación de este orgánulo celular con los restantes componentes de la célula, como puede ser el retículo endoplasmático. Recientemente se ha establecido la existencia de estructuras de la membrana del retículo endoplasmático asociadas a mitocondrias (MAM), regulando estas estructuras diversos procesos celulares como el metabolismo de lípidos, la gestión del calcio, la autofagia, el estrés oxidativo o la gestión de las proteínas mal plegadas. Además de ello se ha relacionado la alteración de las MAM con la aparición de distintas enfermedades cardiacas incluida la cardiomiopatía dilatada (Silva-Palacios *et al.*, 2020). Relacionado con todos los sucesos previamente descritos, los corazones pertenecientes a esta

patología presentan un incremento en la apoptosis de sus cardiomiocitos y una intensa remodelación del ventrículo izquierdo, pudiendo dar lugar al fallo cardiaco. Diversos trabajos han relacionado el papel fundamental que juega la alteración de la homeostasis del retículo endoplasmático, y la consiguiente respuesta inducida por ello, en la apoptosis de cardiomiocitos observada en la cardiomiopatía dilatada (Hamada et al., 2004) (Al-Yacoub et al., 2021).

2.4.4 Fibrilación atrial (AF)

La fibrilación atrial (AF) es una arritmia cardiaca común que afecta a unos 33,5 millones de personas a nivel mundial. Su prevalencia se encuentra en aumento debido al envejecimiento de la población, ya que cada vez más pacientes de edad avanzada sobreviven a eventos cardiacos potencialmente mortales, dejándoles debido a ello expuestos a efectos insidiosos de las enfermedades cardiacas subyacentes, como es el caso de la AF (Hindricks *et al.*, 2018). Se observa una prevalencia de 1 cada 25 personas mayores de 60 años y 1 de cada 10 mayores de 80 por esta arritmia. Los hombres tienen 1,5 veces mayor probabilidad de presentar esta arritmia, siendo factores de riesgo el sexo y la edad, además de distintas enfermedades cardiacas intrínsecas como el infarto de miocardio, la hipertrofia del ventrículo izquierdo y patologías valvulares entre otras, influyendo también el consumo de tabaco, hipertensión, obesidad, diabetes y distintas alteraciones genéticas (Bhatt y Fischer., 2015). Análisis genéticos han establecido que el factor de transcripción *Pitx2* juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de distintos factores de crecimiento, microRNAs y canales iónicos que inducen alteraciones morfológicas y moleculares promoviendo la aparición AF. Se han identificado distintas variantes de riesgo en el locus 4q25, las cuales se asociaban estrechamente con esta patología, siendo posible que los elementos reguladores dentro de este *locus*, pudiesen influir en la expresión del gen que codifica *Pitx2*, produciendo una alteración en la función cardiaca y la FA (Gudbjartsson et al., 2007). Se ha establecido una relación física entre 4q25 y el promotor de *Pitx2* (Aguirre et al.,2015; Zhang et al.,2019), respaldando esta observación la función reguladora sobre este factor de transcripción, determinándose que la perdida de función de *Pitx2* favorecía la aparición de arritmias auriculares (Wang et al.,2010; Kirchhof *et al.*,2011). La insuficiencia de

Pitx2c producía la remodelación de los genes que codifican para *Wnt8* y *Wn11*, traduciéndose en una desregulación de los canales iónicos (Lozano *et al.*, 2016).

Esta patología es una arritmia frecuente presente en otras enfermedades cardiovasculares como la cardiomiopatía dilatada, afectando de forma negativa a la progresión de estas dos enfermedades de forma conjunta, aumentando el riesgo de accidente cerebrovascular. Además de ello, la cardiomiopatía dilatada afecta al riesgo de sufrir AF mediante el aumento de la presión auricular hasta niveles excesivos, una expresión genética alterada, una conducción cardíaca anormal y una remodelación de la estructura del corazón, induciendo todo ello alteraciones eléctricas y de conducción en el corazón dando lugar a la aparición de AF (Carlisle *et al.*, 2019)

2.5 Estrés del retículo endoplasmático y vía UPR

El retículo endoplasmático (RE) se caracteriza por su estructura dinámica que dicta su función biológica. Este orgánulo está compuesto por un sistema de membranas relacionadas con la envoltura nuclear, además de una zona de retículo endoplasmático periférico compuesta por láminas y túbulos. La síntesis, plegamiento y modificaciones post-transduccionales de proteínas de secreción y membrana sintetizadas por este orgánulo tienen lugar en dentro de las láminas, también conocidas con retículo endoplasmático rugoso, dada la alta tasa de ribosomas adherido con gran cantidad de ARNm. Por otro lado, los túbulos son lisos y muy curvados albergando la maquinaria de almacenamiento de calcio y síntesis de lípidos. La estructura de este orgánulo puede adaptarse rápidamente con el objetivo de satisfacer las demandas celulares, por lo que células de distintos orígenes y funciones, muestran arquitecturas de retículo endoplasmático diversas (Di Conza y Ho; 2020).

El sistema de control de calidad del retículo endoplasmático se encarga de identificar a las proteínas plegadas correctamente para su posterior exportación al aparato de Golgi, además de identificar a las proteínas mal plegadas, siendo estas retenidas en el retículo endoplasmático para su correcto plegamiento o para ser degradadas por la maquinaria de degradación asociada al RE (*ERAD*). El plegamiento correcto de proteínas es uno de los pasos más importante en su síntesis y la acumulación de proteínas con un plegamiento incorrecto en la luz del RE, altera el correcto

funcionamiento de este orgánulo generan un estado de estrés conocido como estrés del retículo endoplasmático (ER Stress). El establecimiento de estos estrés puede desencadenar el inicio de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), estando compuesta por una cascada de vías adaptativas de señalización cuyo objetivo es recuperar la homeostasis de este orgánulo y de la célula. Sin embargo, si este estrés es muy pronunciado o mantenido en el tiempo, la vía UPR puede no ser capaz de recuperar la homeostasis y correcto funcionamiento del RE, pudiendo producir la apoptosis celular (Rashid *et al*; 2015).

La vía UPR está compuesta por tres ramas principales, operando en paralelo y usando mecanismos únicos de transducción de señales. Estas ramas están definidas por una clase de componentes de señalización transmembrana residentes en el RE, tales como *IRE1* (Enzima requeridora de inositol 1), *PERK* (kinasa del retículo endoplasmático similar a protein kinasa activada por ARN bicatenario) y *ATF6* (factor activador de la transcripción 6). Evolutivamente *IRE1* fue la primera vía de señalización descrita, sumándose posteriormente *ATF6* y *PERK*. La activación de cada una de las ramas conduce a la producción de factores de transcripción que funcionan solos o de manera combinada para activar los genes diana de esta vía (Walter y Ron.,2011).

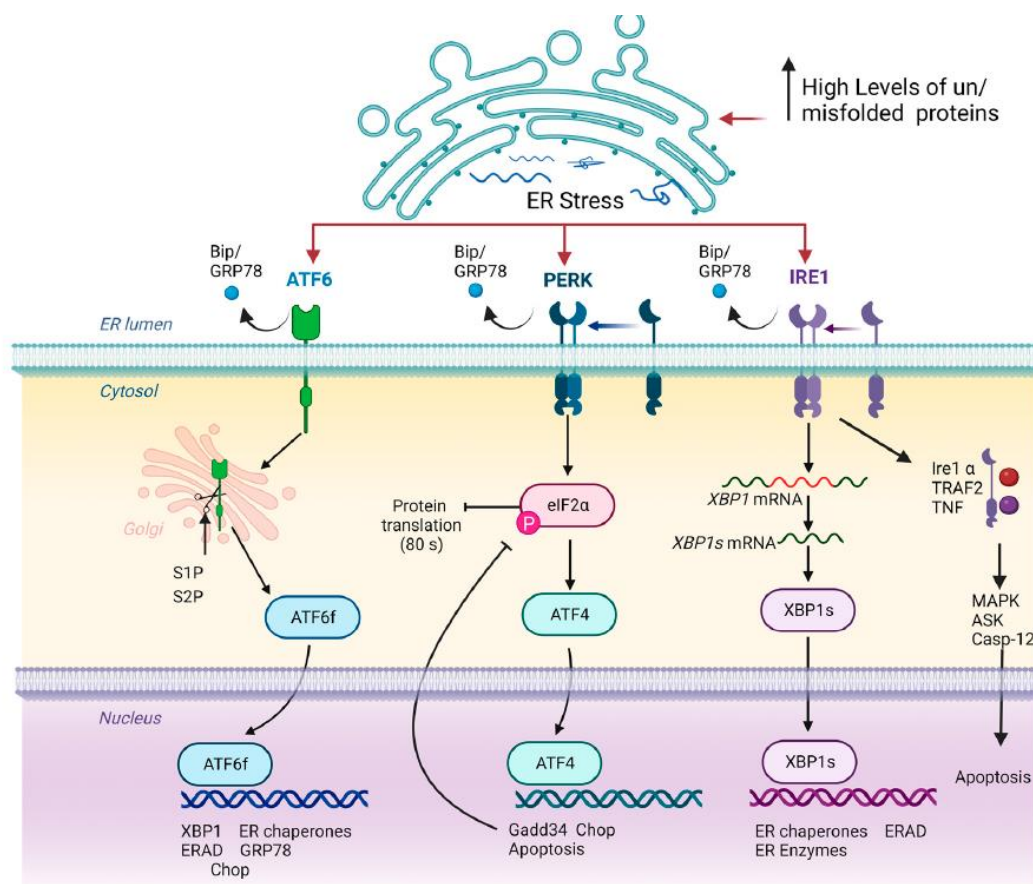


Figura 7. Esquema de las distintas moléculas de la vía UPR. En condiciones homeostáticas, *IRE1*, *ATF6* y *PERK* se encuentran unidos a la chaperona del RE *BIP/GRP78* en la membrana del RE ejerciendo funciones sensoriales. La pérdida de esta homeostasis debida a la acumulación de proteínas sin plegar o mal plegadas desencadena la liberación y activación de estas tres moléculas. *ATF6* es procesado adquiriendo actividad transcripcional, *IRE1* y *PERK* activan a *ATF4* y *XBP1s* respectivamente permitiéndoles realizar sus funciones transcripcionales. Dentro del núcleo, *ATF6*, *ATF4* y *XBP1s* inician la expresión de un grupo de genes que favorecen la recuperación de la proteostasis (Martínez-Amaro *et al.*, 2023).

2.5.1 Vía ATF6

En mamíferos existen dos isoformas de ATF6, siendo estas *ATF6α* (670 aminoácidos) y *ATF6β* (703 aminoácidos). El extremo carboxilo-terminal de estas moléculas se encuentra dentro del lumen del retículo endoplasmático, mientras que el extremo amino-terminal se encuentra en el citoplasma. La porción citoplasmática contiene dominios de activación transcripcional y de unión al ADN, seguido de un dominio transmembrana de 20 aminoácidos. Ambas isoformas poseen homología de secuencia, aunque poseen dominios de activación distintos, siendo *ATF6α* un potente activador transcripcional, presentando *ATF6β* una actividad opuesta y pudiendo inducir la inhibición de *ATF6α*.

Cuando se establece el estado de estrés del retículo, *ATF6* deja de estar unido a la chaperona de *Bip*. *ATF6 α* expone dos secuencias de translocación al aparato de Golgi dentro de su dominio luminal, siendo posteriormente translocado a este orgánulo. En el aparatado de Golgi es procesado de forma secuencial por las proteasas *S1P* y *S2P*, eliminando el dominio luminal y de anclaje transmembrana respetivamente, produciendo finalmente un fragmento citoplasmático de 50 kDa (*ATF6f*)(Hillary y Fitzgerald, 2018). Este fragmento queda libre en el citoplasma, para ser posteriormente traslocado al núcleo, induciendo la activación de genes relacionados con la vía UPR, y la modificación de los niveles de distintos microARNs(Choi y Yu., 2023).

En el corazón *ATF6 α* gobierna la respuesta de supervivencia de los cardiomiocitos expuestos a estímulos de crecimiento, pudiendo jugar un papel en la protección frente a hipertrofia cardiaca patológica y de insuficiencia cardiaca. En tejido cardiaco de ratones mutantes deficientes para *ATF6* se observó un mayor daño y una función disminuida después de la lesión tras isquemia y reperfusión, por lo que se puede hipotetizar que *ATF6* puede jugar un papel protector (Hillary y FitzGerald.,2018).

2.5.2 Vía PERK

PERK, codificado por el gen *eIF2AK3*, es una proteína transmembrana tipo I residente en el RE, siendo una de las cuatro quinasas del factor de iniciación eucariota 2 alfa (*eIF2 α*). La región amino terminal de *PERK* se encuentra ubicada en el lumen del RE, siendo importante esta región para su dimerización, regulación y asociación con *Bip*, por otro lado, la región carboxilo-terminal contiene un dominio citoplasmático serina/treonina proteína quinasa. Cuando se establece el estado de estrés del RE, las proteínas sin plegar o mal plegadas se unen a *Bip*, permitiendo esto la liberación de *PERK*, favoreciendo su activación mediante autofosforilación y su dimerización. Una vez activado fosforila a *eIF2 α* , inhibiendo la traducción del ARNm y la síntesis de proteínas, reduciendo de esta manera el estrés, concediendo tiempo al RE para procesar las proteínas sin plegar o mal plegadas acumuladas. Cuando *eIF2 α* se encuentra fosforilado reduce su actividad reduciendo la traducción de ARNm, excepto en el caso de algunos ARNm que poseen marcos de lectura abiertos cortos en la región 5´no traducida, por lo que se traducen preferentemente en estas condiciones, siendo un ejemplo de ellos el factor activador de transcripción 4 (*Atf4*). Este factor de transcripción se activa en respuesta a distintas

señales de estrés y regula la transcripción de genes clave implicados en el plegamiento de proteínas, autofagia, metabolismo de aminoácidos, homeostasis redox y apoptosis, para desencadenar distintas respuestas adaptativas. Entre estos genes se encuentra *CHOP*, también conocido como proteína homóloga *C/EBP* o *GADD153*, que se encuentra regulada positivamente por *ATF4* y tiende a favorecer la expresión de genes correctivos incluido *XBP1* y chaperonas (Huang *et al.*, 2023), actuando *CHOP* también como inhibidor de la expresión de la proteína antiapoptótica *Bcl-2*, pudiendo activar la apoptosis dependiente de mitocondrias (Oakes y Papa.,2015)

Además de la inducción de la apoptosis dependiente de las mitocondrias, *PERK* puede encontrarse en puntos de contacto entre RE y mitocondrias, generando un eje entre *PERK* y las mitocondrias, permitiendo de esta manera que *PERK* también detecte estrés en las mitocondrias, para poder adaptar sus funciones y prevenir la apoptosis. La activación de *PERK* ante un estado de estrés del RE puede desencadenar la hiperfusión de mitocondrias, previniendo la escisión mitocondrial prematura y la apoptosis. Esta activación también tiene otros efectos sobre las mitocondrias como la mayor formación de crestas mitocondriales y la formación de supercomplejos respiratorios, mejorando de esta manera la capacidad de síntesis de ATP, además de mejorar el control de calidad mitocondrial al favorecer la expresión de chaperonas mitocondriales, su biogénesis y mitofagia, resultando todo ello en una renovación de la red mitocondrial (Almeida *et al.*, 2022).

2.5.3 Vía IRE1

IRE1 presenta dos isoformas *IRE-1 α* e *IRE-1 β* , siendo el patrón de expresión de *IRE-1 α* más amplio en tejidos y tipos celulares y participando de forma clave en la UPR. *IRE-1 α* posee una región citoplasmática con dominios serina/treonina quinasa y endoribonucleasa (RNAsa). Ante un estado de estrés del RE, *IRE-1 α* queda liberada de Bip y se activa mediante oligomerización y autofosforilación, produciendo un cambio estructural activando el dominio RNAsa. Tras la activación *IRE-1 α* , esta proteína escinde un intrón de 26 nucleótidos del ARNm que codifica a la proteína 1 de unión al factor de transcripción caja X (*XBP1*), favoreciendo la expresión de una forma más estable y activa de este gen, denominada *XBP1*, actuando como factor de transcripción para genes relacionados con UPR. *IRE-1 α* también presenta la capacidad de inducir la actividad de

descomposición dependiente de *IRE1* del ARNm, lo que ayuda a aliviar el estrés del RE. *IRE-1α* también presenta funciones de señalización, como la activación de la quinasa Jun N-terminal (*JNK*)₂ inducida ante condiciones de estrés e interactúa con distintos participantes de la muerte celular como la caspasa 12. La actividad RNasa de *IRE-1α* actúa mediante la supresión de la acumulación de microRNAs, como por ejemplo mir-17, miR-34a, miR-96 y miR-125b, que reprimen la traducción de proteínas proapoptóticas (Choi y Yu., 2023).

El mantenimiento de la activación de *IRE1* tiene como resultado la apoptosis, al interactuar con el factor receptor 2 asociado al factor de necrosis tumoral 2 (*TRAF2*) y la proteína adaptadora del factor de necrosis tumoral (*TNF*) (Urano *et al.*, 2000), para formar un complejo que recluta a la proteína quinasa activada por mitógenos (*MAPK*), a la quinasa reguladora de señales apoptóticas (*ASK*) y a la caspasa 12, para inducir la apoptosis (Nishitoh *et al.*, 2002) (Nakagawa *et al.*, 2014).

2.5.4 Contribución del estrés de RE en las enfermedades cardiovasculares

Como previamente se ha mencionado las enfermedades cardiovasculares son una de la principal causa de mortalidad y minusvalía a nivel mundial. Los factores patológicos y fisiológicos de estas enfermedades, como los trastornos metabólicos, hipoxia e inflamación, entre otros, imponen una alta exigencia a la maquinaria de plegamiento de proteínas del RE, desencadenando de esta manera el estrés del RE. A la vez, este estado de estrés puede inducir la inflamación y estrés oxidativo, la UPR puede inducir apoptosis y la interrupción de la comunicación entre orgánulos en los cardiomiocitos y células endoteliales pudiendo esto provocar efectos negativos dentro de las patologías cardiovasculares (Ren *et al.*, 2021).

Se ha establecido que la respuesta generada por las células cardiacas frente al estrés del RE a corto plazo desempeña un papel protector en el corazón (Das *et al.*, 2023). Durante este estado de estrés se producen distintos cambios en el RE, como el incremento en los niveles de chaperonas como *Bip*, además del incremento de tamaño este orgánulo. Además de ello, en el infarto de miocardio y en el miocardio en estado de isquemia se activa las vías UPR y ERAD, observándose que cuando *ATF6* se encuentra incrementado en condiciones de isquemia/reperfusión protege frente a la pérdida de

tejido en ratón, además de que un incremento de *Bip* ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo en cardiomiocitos (Jin *et al.*, 2017)). Aunque la UPR en un primer momento pueda ser beneficiosa, si esta activación se mantiene en el tiempo puede inducir apoptosis y daño tisular, como previamente se ha afirmado, esta acción se puede observar en ratas sometidas a paro cardíaco y reanimación, en las que se observa un incremento en los niveles de *CHOP* y caspasa 3 activada, indicando esto la inducción de la apoptosis mediada por estrés del RE, pudiendo explicar este incremento de moléculas relacionadas con el estrés del RE el deterioro del funcionamiento del corazón después de un paro cardíaco (Millot *et al.*, 2012).

En los últimos años se han identificado que el estrés del retículo se encuentra relacionado con la progresión de distintas patologías, como son la hipertrofia cardíaca, el fallo cardíaco, el infarto de miocardio, la aterosclerosis, entre otras (Zhu *et al.*, 2022, Li *et al.*, 2019, Bischoff *et al.*, 2017).

Varias patologías cardíacas se asocian con una hipertrofia patológica del ventrículo izquierdo, siendo inicialmente esta hipertrofia una respuesta adaptativa con el fin de mantener la función cardíaca y disminuir la tensión a la que puede estar sometida la pared ventricular. Sin embargo, esta hipertrofia puede derivar a un estado patológico conduciendo a una remodelación desadaptativa del corazón pudiendo presentar un adelgazamiento del miocardio, reducción del gasto y contractibilidad cardíaca y una dilatación de las cámaras, lo que conlleva a desencadenar una insuficiencia cardíaca. En esta condición de hipertrofia patológica se produce por tanto un aumento en estos requerimientos (Blackwood *et al.*, 2020). En este contexto de hipertrofia, se ha observado en ratones a los que se le había inducido hipertrofia cardíaca mediante constricción aórtica transversal, la expresión de chaperonas de RE se vio aumentada en sus corazones, además de aumentar la expresión de caspasa 3 en sus células (Okada *et al.*, 2004). En distintos estudios se estableció el aumento en los niveles de *CHOP* en ratones sometidos a la misma técnica de inducción de hipertrofia cardíaca, en cambio, ratones nulos para *CHOP* a los que se le realizó una restricción transaórtica mostraron una atenuación en la hipertrofia y disfunción cardíaca en comparación con ratones wild type, indicando esto el posible papel que juega *CHOP* en el establecimiento de la hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Por otro lado, análisis mediante microarrays

mostro la regulación de *CHOP* sobre distintas moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia de *Bcl-2* (Fu et al., 2010). En pacientes humanos con insuficiencia cardiaca se identificó un aumento de estrés oxidativo, hipoxia y de la proteína de estrés del RE *Grp78*, también conocida como Bip, además de en los niveles de ARNm de *Atf4* y *Chop*, indicando así una posible relación de la vía UPR y la patogénesis de la insuficiencia cardiaca en humanos (Choy et al., 2018).

En el fallo cardiaco se puede identificar una remodelación eléctrica arritmogénica principalmente debida a la alteración de distintos canales iónicos. En este contexto se ha determinado el papel que juegan algunas moléculas de la UPR en la modulación de los canales iónicos cardiacos, debido a que como se ha expuesto anteriormente, la activación de la vía UPR produce una reducción en la síntesis de proteínas. Siendo un ejemplo lo que ocurre en fallo cardiaco humano, en el que se han detectado niveles elevados de variantes de *splicing* alternativo anormales para el gen *SCN5A*. Este gen codifica la subunidad α del canal de sodio *Nav1.5*, dando su alteración como resultado proteínas truncadas y no funcionales atrapadas en el RE. Esta acumulación conduce a la activación de la vía UPR, concretamente de *PERK*, produciendo una regulación negativa de la expresión de *Nav1.5* de longitud completa y funcional, generando reducción en los niveles de sodio y una disminución en la velocidad de conducción. Este efecto sobre los canales iónicos no se encuentra limitado a este canal, si no que se ha observado también la afectación de *KCND3*, que codifica a la subunidad α del canal *Kv4.3*, produciendo una mayor resistencia eléctrica de la membrana con el consiguiente acortamiento de la duración del potencial de acción cardiaco (Liu y Dudley., 2018).

En el contexto del infarto de miocardio, se ha observado como distintas moléculas de la vía UPR ejercen un papel regulador en la progresión y gravedad de esta patología. Como previamente se ha enunciado, el infarto de miocardio puede ser consecuencia de la reducción en el aporte de oxígeno y la deficiencia de nutrientes debida a la alteración del flujo sanguíneo en el miocardio. En esta condición de isquemia en humanos, se ha observado como los niveles de *BIP* y *XBP1* se ven aumentados, observándose que la inducción de BIP reduce la muerte de cardiomiocitos mediante la inhibición del proteasoma, el complejo proteico encargado del reciclaje de proteínas. En un modelo murino de isquemia/reperfusión (I/R), se determinó que la eliminación

específica de *Xbp1* en cardiomiocitos provocaba el aumento de la zona infartada, la reducción de la función cardíaca y el desarrollo de hipertrofia, por otro lado, su sobre expresión tenía como consecuencia una reducción del tamaño de la zona infartada y la mejoría de la función cardíaca (Kubra *et al.*,2020).

Otra patología cardiovascular en la que se ha determinado la posible participación del estrés del RE y UPR es la aterosclerosis. Muchos factores de riesgo para esta enfermedad como el estrés oxidativo o la acumulación de colesterol libre en los macrófagos contribuyen al establecimiento del estrés del RE. Por otro lado, los mecanismos moleculares implicados en este estado de estrés y la vía UPR se han identificado como moduladores de la etiología de esta patología. Por ejemplo, en lesiones de arteria coronaria humana se han observado niveles elevados de *CHOP* y *BIP*, sugiriendo un posible papel del estrés del retículo y de los mecanismos de respuesta a este estado. El estrés del RE favorece el desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones a través de la apoptosis inducida por UPR y *CHOP* en macrófagos causada por la acumulación de colesterol en el RE, confirmándose esta idea al observarse que los niveles aumentados de colesterol activan la apoptosis dependiente de estrés del RE en macrófagos de ratón *in vitro* (Ren *et al.*,2021).

2.5.5 Regulación de los lncRNA sobre la vía UPR en las enfermedades cardiovasculares

La regulación del estrés del RE y UPR se lleva a cabo mediante una compleja red de numerosas vías moleculares incluyendo moduladores transcripcionales y post-transcripcionales. En el contexto cardiovascular se han identificado diversos lncRNAs que modulan la progresión de distintas patologías y estados mediante la regulación del estrés del retículo endoplasmático y la vía UPR, siendo alguno de ellos *HypERlnc*, en el caso de la hipoxia, *MEG 3* y *DANCR* en el infarto de miocardio, *UCA1* en la Isquemia y reperfusión, *NRB2* en la hipertrofia cardíaca y *AC061961.2* en la cardiomiopatía dilatada.

2.5.5.1 Hipoxia

El primer estudio sobre la importancia de los lncRNAs en las enfermedades cardiovasculares a través de la regulación de la vía UPR fue proporcionado por Bischoff y colaboradores, al describir la función que realizaba el lncRNA *HypERlnc*, el cual actúa como un represor fundamental de la vía UPR mediante la inhibición de la activación

transcripcional de *Atf6*, *Ire1* y *Bip* en pericitos expuestos a condiciones hipóxicas. Además de ello, los niveles de este lncRNA se encontraban reducidos en muestras de tejido humano de pacientes con insuficiencia cardíaca. De forma complementaria observaron que los niveles de expresión de *HypERlnc* se encontraban correlacionados con marcadores de pericitos en pulmones humanos de pacientes con hipertensión pulmonar idiopática, además de observar que la pérdida de función de este lncRNA afectaba al fenotipo, proliferación y supervivencia de los pericitos (Bischoff *et al.*, 2017).

2.5.5.2 Infarto de miocardio e Isquemia/ reperfusión(I/R)

En el infarto de miocardio se han identificado varios lncRNA que regulan la progresión de esta patología mediante la regulación de distintas moléculas involucradas en la vía UPR.

En este contexto, se identificó una posible relación de esta patología y los niveles del lncRNA *MEG3*, observándose un incremento de su expresión en corazones infartados y miocitos neonatales ventriculares hipóxicos de ratón. En este trabajo se estableció que la reducción de los niveles de *MEG3* conllevaban una mejoría en la función cardíaca, un incremento en la fracción de eyección, acortamiento del tiempo de eyección, y del diámetro del ventrículo izquierdo al finalizar la sístole y de la diástole en el modelo de ratón de infarto de miocardio. En el mismo estudio, se observó una reducción de la citotoxicidad en miocitos neonatales ventriculares hipóxicos de ratón mejorando su viabilidad, relacionando la deficiencia de este lncRNA revertía la apoptosis mediante la represión de *Bip/Grp78*, *Atf4*, *PERK*, *Eif2 α* , *Chop* y caspasa 3 (Li *et al.*, 2019).

El lncRNA *DANCR* ejerce un papel protector frente a la apoptosis de cardiomiocitos en esta patología, siendo interesante tener en cuenta que los niveles de este lncRNA se ven reducidos cuando se induce estrés del RE mediante el tratamiento con tunamicina. Este tratamiento induce apoptosis mediada por el estrés del RE al producir el incremento de los niveles de caspasa 3, *Grp78*, *IRE1 α* , *Xbp1s*, *Atf6* y *Atf4*. Se determinó un aumento de la muerte celular y reducción de los niveles de viabilidad celular, proliferación y autofagia en células H9C2 tratadas con tunamicina, siendo este efecto revertido cuando se inducía la sobre expresión de *Dancr*, al promover la reducción en los niveles de *Bip/Grp78* y aumentar los niveles de proteínas antiapoptóticas como

Bcl-2. Además de ello favorecía los niveles de *IRE1α*, *Xbp1s*, pudiendo esto indicar una activación selectiva de la vía de IRE1, favoreciendo la autofagia y ERAD aliviando el estrés del RE. También identificaron la actividad de este lncRNA como esponja de *miR-6324*, el cual se encuentra regulado al alza en IM ejerciendo papeles deletéreos en la progresión de esta patología (Li *et al.*, 2021).

Tras un infarto de miocardio, es usual que suceda un evento de isquemia en la zona infartada y una subsiguiente reperfusión, debido a la eliminación de la causa de la aparición de esta condición isquémica con una reperfusión del tejido afectado posterior. En la I/R se ha identificado al lncRNA *UCA1*. Este lncRNA se encuentra regulado a la baja en modelos de cardiomiocitos H2C9 de lesiones tras I/R. Chen y colaboradores describieron esta regulación a la baja y realizaron estudios de pérdida de función de lncRNA observándose un incremento en la expresión de *Atf6*, *PERK* y *Bip/Grp78*, provocando esto una reducción en la supervivencia de estas células además de incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Posteriormente realizaron ensayos de ganancia de función y determinaron una reducción de la apoptosis mediante el bloqueo de la expresión de *Atf6*, *PERK* y *Bip/Grp78*, la reducción de ROS (Chen *et al.*, 2019).

2.5.5.3 Hipertrofia cardiaca

En el contexto de la hipertrofia cardiaca, Zhu y colaboradores identificaron niveles reducidos del lncRNA *NRB2* en plasma de pacientes con hipertrofia del ventrículo izquierdo. Por ello indujeron hipertrofia en cardiomiocitos humanos y observaron la regulación a la baja de este lncRNA además del incremento de marcadores de hipertrofia como *ANF* o *BMP10*. También identificaron que la regulación al alza de *NRB2* en células cardiacas humanas producía una reducción en los niveles de marcadores de hipertrofia y de *PERK*, *IRE1*, *BIP/GRP78* y *CHOP*. Esta regulación al alza también incrementaba la expresión de *LKB1*, *AMPK* y *SIRT1*, siendo estos genes de respuesta al metabolismo hipertrófico (Zhu *et al.*, 2022).

2.5.5.4 Cardiomiopatía dilatada

Análisis transcriptómico de corazones de rata que sufría esta patología mostraron la regulación a la baja del lncRNA *AC061961.2*. Análisis de expresión y funcionales

demonstraron la que inducción *in vitro* e *in vivo* de DCM reducía los niveles de este lncRNA mientras que incrementaba los niveles de *Grp78*, *Chop* y caspasa3, además de reducir los niveles de β -*catenina*, *Axina 2* y *c-Myc* sugiriendo una regulación a la baja de la vía *Wnt*/ β -*catenina*. Estudios de ganancia de función revertían estos efectos en la apoptosis y la activación de la vía *Wnt*/ β -*catenina*, además de incrementar los niveles de *Bcl-2* y reprimir los de *Bip/Grp78*, *Chop* y Caspasa 3(Qiu *et al.*,2021).

Como se ha podido observar, en los últimos años se han identificado distintos lncRNAs que actúan regulando la progresión de distintas patologías cardíacas a través de distintos mecanismos, entre los cuales se encuentra la vía UPR. Por ello es necesario seguir estudiando la relación existente entre los lncRNAs y las patologías cardíacas, además de estudiar si los lncRNA que se encuentran involucrados en una patología concreta, pueden ejercer algún tipo de función en el contexto de una patología cardíaca distinta.

2.6 lncRNA *Walras*, *Walar*, *Walaq*, *Walrad* y *Wallrd*

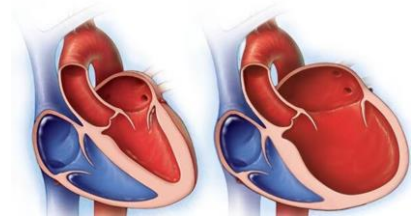
En el contexto de la AF, se ha descrito un rol fundamental de *Pitx2* en la regulación de distintos factores de crecimiento, microRNAs y canales iónicos desencadenando alteraciones morfológicas y funcionales (refs). Nuestro grupo estudió la posible contribución de distintos lncRNAs dentro de la vía de señalización *Pitx2*>*Wnt*>*microRNAs* (García-Padilla *et al*; 2022). Mediante análisis *in silico* se identificó la expresión diferencial de varios lncRNAs anotados en las proximidades de los *loci* cromosómicos de *Pitx2*, *Wnt8* y *Wnt11*, llamados *Walras*, *Walaq*, *Walce*, *Wallrd* y *Walrad*, en ratón. Entre estos lncRNA destacó *Walras*, anotado como *Gm44934*, el cual es un lncRNA constituido por 238 bases, que está regulado por *Pitx2*, *Wnt8* y *Wnt11* y cuyos niveles se ven modulados en cardiomiocitos primarios de ratón tras la aplicación de sustancias pro-arritmogénicas y pro-hipertróficas. Mediante estudios de *pull down* de *Walras*, se estableció su asociación con proteínas citoplasmáticas, nucleares y mitocondriales relacionadas con la fisiopatología cardíaca, además del establecimiento de su papel modulador de la organización del citoesqueleto mediante el uso de análisis de pérdida de función. En el mismo estudio se estableció la expresión preferentemente nuclear de *Walras*. Por otro lado, se estableció la existencia de homología entre *Walras* y varios

lncRNA humanos, siendo estos *AP002340.1* y *LINC02761*, presentando una homología del 43,1 % y 31,1 % respectivamente (García-Padilla et al; 2022).

Como se ha podido observar a lo largo de esta introducción el establecimiento y progresión de las patologías relacionadas con el corazón, junto con el correcto desarrollo de este órgano, se encuentran altamente regulado. La importancia de los lncRNAs ha quedado confirmada tanto en la patología como en el desarrollo cardiovascular, siendo algunos ejemplos los lncRNA *HypERlnc*, *MEG3*, *AC061961.2* en el caso de las patologías cardíacas o *Bvht*, *CARMEN* o *Hand2os1/Uph*, en caso del desarrollo cardíaco.

Teniendo en cuenta la importancia de los lncRNA en general y quedando establecida la importancia de *Walras*, junto con los demás lncRNAs identificados en el trabajo previo de nuestro grupo en la AF (García-Padilla et al.,2022), se decidió estudiar la posible relación de estos lncRNAs en el contexto de la cardiomiopatía dilatada, al ser la FA una de las comorbilidades presentes en dicha patología, con el objetivo de identificar el posible papel regulador, y su mecanismo de acción, en el contexto de la cardiomiopatía dilatada, y otras patologías cardíacas, mediante el uso de modelos de ratón y distintos estudios moleculares.

OBJETIVOS/AIMS



3.Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de distintos lncRNAs, cuya importancia se había descrito previamente por nuestro grupo en la fibrilación atrial, en el contexto de las cardiomiopatías.

Siendo los objetivos específicos:

1. Determinar los niveles de expresión de los lncRNAs *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en ratones con cardiomiopatía dilatada y cardiomiopatía hipertrófica, y su distribución celular.
2. Analizar el papel del lncRNA *Walras* en la cardiomiopatía dilatada, y su posible mecanismo de acción.
3. Estudiar la posible homología funcional de *LINC02761* y *AP002340.1* como homólogos humanos de *Walras*.

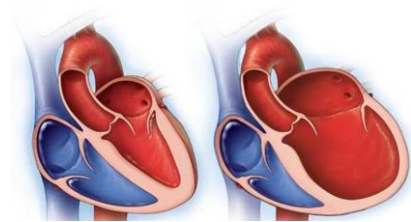
AIMS

The general objective of this work is the study of different lncRNAs, whose importance had been previously described by our group in atrial fibrillation, in the context of cardiomyopathies.

The specific objectives being:

1. Determine the expression levels of the lncRNAs *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* and *Walras* in mice with dilated and hypertrophic cardiomyopathy, respectively, and their cellular distribution.
2. Analyze the functional role of lncRNA *Walras* in dilated cardiomyopathy, and its possible mechanism of action.
3. Study the possible functional homology of *LINC02761* and *AP002340.1* as human homologs of *Walras*.

MATERIALES Y MÉTODOS



4. Materiales y Métodos

Tejidos y embriones de Ratón

En este trabajo se han usado muestras de ventrículo izquierdo de diferentes modelos de ratón que presentaban cardiomiopatía dilatada -LMNA^{R249W}(Lmna249), alphaMHCCRE-LmnaFloxFlox (LmnaCRE), cardiomiopatía hipertrófica -Mybc3-p109(Mybpc3)- y de la zona infartada, borde de la zona infartada y ventrículo izquierdo de un modelo experimental de infarto de miocardio en ratón. El modelo LmnaCRE, que presenta una delección del gen de la lamina en todo el miocardio en desarrollo y adulto, ha sido suministrado por el grupo de la Dr. Francesca Rochais del Instituto de Medicina Genética de Marsella (MMG). El modelo Lmna249, que presenta una mutación puntual sistémica del gen de la lamina A/C, ha sido cedido por el grupo del Dr. Ignacio Pérez de Castro del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) produciendo el desarrollo de DCM, en ambos casos debido a la alteración de la lamina. Finalmente, el modelo de cardiomiopatía hipertrófica Mybpc3 presenta una delección de este gen generada mediante CRISPR. El gen Mybpc3 codifica a la proteína de unión a la miosina C y ha sido generado y cedido por grupo del Dr. José Luis de la Pompa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). En los tres modelos previamente citados, las alteraciones cardiovasculares son más significativas en machos respecto a hembras. Finalmente, las muestras del modelo de infarto de miocardio fueron generadas y cedidas por la Dr. Francesca Rochais del Instituto de Medicina Genética de Marsella (MMG).

El sacrificio y obtención de muestras de los distintos modelos se realizaron siguiendo las normas bioéticas de cada una de las instituciones a las que pertenecían. Brevemente, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, posteriormente se obtuvo el corazón y se tomaron muestras de las zonas de interés para nuestro estudio. Estas muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso.

Los embriones usados en este trabajo se obtuvieron a partir de ratonas CD1 preñadas, tras 14 días post coito, sacrificadas mediante dislocación cervical. Se procedió a la extracción de los cuernos uterinos, siendo lavados para retirar los restos de sangre en PBS estéril. A continuación, se obtuvieron los embriones, con cuidado de no dañarlos, manteniéndose durante la extracción todo el tejido y los embriones en PBS frío estéril.

Cultivos celulares y tratamientos

Se usaron tres tipos distintos de líneas celulares de ratón: a) HL1 (Merck), una línea de cardiomiocitos atriales inmortalizados derivados de una hembra adulta de la cepa C57BL/6J de ratón, capaces de continuar su división y capacidad de latido manteniendo un fenotipo cardiaco diferenciado, usadas para el estudio de la regulación de la señalización, metabolismo, conducción y transcripción, además de su uso para analizar condiciones patológicas como la apoptosis o los análisis de isquemia /reperusión, b) MEVECs, línea células endocárdicas ventriculares embrionarias obtenidas a partir de disociación de ventrículos embrionarios de ratón y descritas por D'Amato y colaboradores en su trabajo del año 2016 (D'Amato *et al.*, 2016) cedidas por el Dr. de la Pompa, y c) MEC1 (Merck), línea de células epicárdicas embrionarias de ratón inmortalizadas, que no expresan marcadores miocárdicos o endoteliales, siendo usadas para el estudio de un amplio rango de aspectos de la biología del desarrollo cardiaco. Las células HL1 fueron cultivadas en medio Claycomb (Merck/51800C) suplementado con FBS (Merck/ 7524) al 10%, 100 U/ml penicilina/estreptomicina (Merck/516106), 200 nM de L-glutamina (Gibco/25030081) y Norepinefrina (Merck/489350) a una concentración de 0,1mM. En el caso de las MEVECs y MEC se usó medio DMEM alto en glucosa (Merck/ 0822), suplementado con 10 % de FBS y 100U/ml penicilina/estreptomicina. También se usaron células AC16 (Merck), una línea de cardiomiocitos humanos ventriculares usadas para el estudio génico y funcional durante el desarrollo normal y en condiciones patológicas. Las células AC16 humanas se cultivaron en medio DMEM/F12 (Merck/ 8437) suplementado con el 12,5 % de FBS, 100U/ml penicilina/estreptomicina, 200 nM de L-glutamina. Los cuatro tipos celulares fueron cultivados en placas de plástico de 60 cm², tratadas 24 horas antes con gelatina fibronectina en el caso de las HL1 y tratadas 1 hora antes con gelatina al 0,1 % en el caso de las MEC1, a 37°C en un incubador para células con humedad controlada y 5 % de CO₂. Las células fueron subcultivadas en placas de 24 pocillos, 24 horas antes de los distintos tratamientos, con su medio correspondiente sin antibiótico.

Las células HL1 fueron transfectadas con el plásmido *Gm44934/Walras*-IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406), el plásmido sin construcción IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406) o *Gm44934/Walras* siRNA (Sigma, Aldrich, Múnich,

Germany), respectivamente, con Lipofentamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron recogidas para su análisis tras 24 horas en el caso del tratamiento con plásmidos y tras 48 horas en el caso del tratamiento con siRNA. Las células HL1 fueron tratadas con β -estradiol (Merck/E2758) a una concentración de 20nM por pocillo y/o tunamicina (Merck/654380) a una concentración de 2 μ M por pocillo, respectivamente, durante 24 horas. HL1 también se trataron con inhibidor de la enzima de activación de la Ubiquitinación E1(HY-13296/Hyculter), al que denominaremos UBA1, a una concentración de 50 nm³ horas después de la inducción de la sobre expresión de *Walras*, siendo recogidas tras 24 horas. Pasado los tiempos de tratamiento, las células se recogieron para su análisis. Los tratamientos se administraron por triplicado en tres pocillos por condición.

Las células AC16 fueron sembradas en placas de 24 pocillos durante 24 horas antes de los tratamientos con su medio correspondiente sin antibiótico. Posteriormente, estas células fueron transfectadas con el plásmido *LINC02761*-IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406) y *APO02340.1*-IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406), el plásmido sin construcción IRES-GFP-pcDNA3.1 y *LINC02761* siRNA a una concentración final de 60 nM por pocillo (Sigma-Aldrich, Múnich, Germany) junto con Lipofentamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células AC16 también fueron tratadas con β -estradiol a una concentración de 20nM por pocillo durante 24 horas. Las células fueron recogidas para su análisis tras 24 horas en el caso del tratamiento con plásmidos y tras 48 horas en el caso del tratamiento con siRNA. HL1 también se trataron con UBA1 durante 3 horas después de la inducción de la sobre expresión de *APO02340.1*, siendo recogidas tras 24 horas. Los tratamientos se administraron por triplicado en tres pocillos por condición.

Generación adenovirus

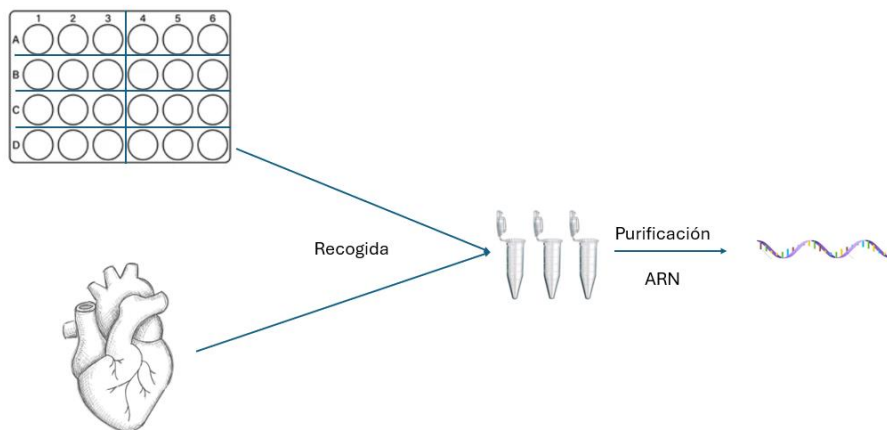
La secuencia completa de *Walras* fue clonada en un Adenovirus junto con el promotor pAV-CMV (pAV-CMV-Walras-GFP #VB230904-1200fkw) (VectorBuilding, Guangzhou, China). Se usó como control negativo el mismo adenovirus, pero que tenía insertada una secuencia *scrambled* (pAV-CMV-GFP) (VectorBuilding, Guangzhou, China).

Infección por Adenovirus

Células HL1 fueron infectadas usando *Ad-Walras-GFP* o *Ad-Scrambled-GFP* (Vectorbuilding, Guangzhou, China) a 240 M.O.I. durante 16 horas en una placa de 96 pocillos previamente tratada con gelatina/fibronectina. Las infecciones con adenovirus se realizaron en cabinas de seguridad biológica, localizadas en las instalaciones pertinentes, del Instituto de Medicina Genética de Marsella (Marsella, Francia) y del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) (Madrid, España)

Aislamiento de ARN

El ARN de las células tratadas se aisló usando el Kit comercial Reliaprep Rna Miniprep System (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En todos los casos al menos tres pocillos distintos fueron recogidos para cada condición. En el caso de las muestras de tejido, el ARN fue extraído y purificado usando Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN purificado se almacenó a -80 °C hasta su uso.



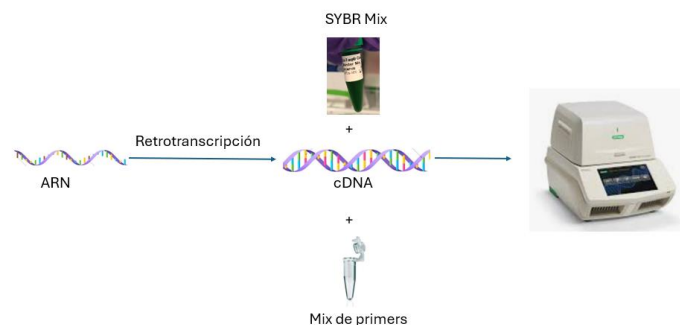
Esquema 1. Aislamiento de ARN a partir de muestras de tejido o células, para su estudio.

Análisis de la distribución núcleo/citoplasma

Las fracciones de ARN citoplasmático y nuclear de las células AC16 fueron aisladas usando el kit comercial Cytoplasmic & Nuclear RNA Purification Kit (Norgen, Belmont, CA, USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, para su posterior retro transcripción y análisis mediante RT-qPCR.

Síntesis de cDNA y análisis mediante RT-qPCR

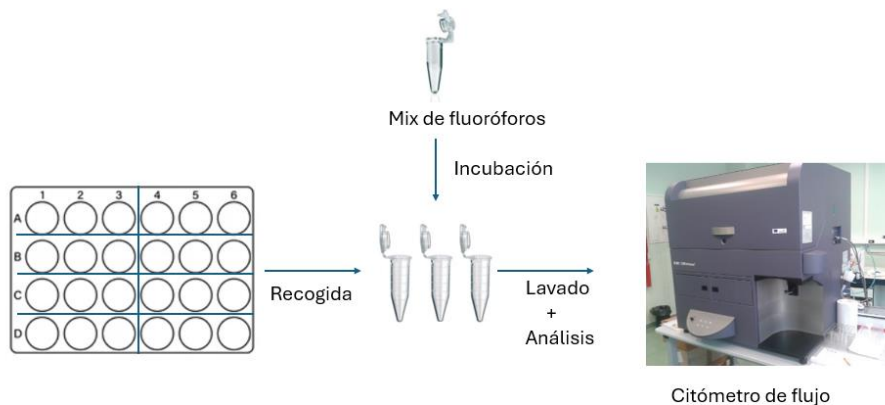
Se realizó la retro transcripción del ARN aislado usando el Kit comercial Maxima first strand cDNA synthesis for RT-pPCR (Thermo Scientific). Para realizar el análisis mediante RT-qPCR en tiempo real, se usó el cDNA sintetizado, la correspondiente combinación de primers y SYBR Green Mix (Promega) usando la guía del producto. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 o 384 pocillos usando cinta de sellado óptico en un volumen final de 10 μ L, depositándola para su análisis en termocicladores CFX96TM oCFX384TM (Bio-Rad) respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron un paso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos compuestos por un paso a 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 10 segundos, 75 °C durante 7 segundos, con un paso final de 95 °C durante 10 segundos. Para determinar la expresión relativa de los distintos genes en estudio, se usó *Gapdh* en el caso de los genes de ratón o PPIA como genes de control interno de la expresión en células humanas. Cada RT-qPCR fue realizada por triplicado y repetida 3 veces para obtener resultados representativos. Los primer fueron diseñados usando el software Primer3 y posteriormente se comprobó su especificidad usando el software Blast (Tabla suplementaria 1). No se observaron amplificaciones en controles de reacción para cada gen usando solo agua como muestra para amplificación. En este trabajo se usó el método Livak y Schmittgen para la relativización de la cuantificación de los resultados asignando a la muestra control un nivel de expresión del 100 % (Livak & Schmittgen, 2001).



Esquema 2. Proceso de RT-qPCR

Análisis de viabilidad celular

La alteración en la viabilidad celular se analizó usando el kit comercial *Apoptosis/Necrosis Detection Kit (Blue, Red, Green) ab176750* (Abcam). Las células fueron recogidas, lavadas con PBS dos veces. A continuación, fueron incubadas con el mix de fluoróforos correspondiente durante 1 hora, conteniendo los fluoróforos Apopxin Deep Red, para la detección de células apoptóticas (Rojo), Nuclear Green DCS1 para la detección de células necróticas (Verde) y Cytocalcein violet 450 para la detección de células viables (Azul). Posteriormente se procedió a su análisis usando el citómetro de flujo LSR Fortessa(BD), usando para cuantificar las células apoptóticas el canal FL4 (Ex/Em = 630/660 nm), para las células necróticas el canal FL1(Ex/Em = 490/520 nm) y las células viables el canal violeta (Ex/Em = 405/450 nm).



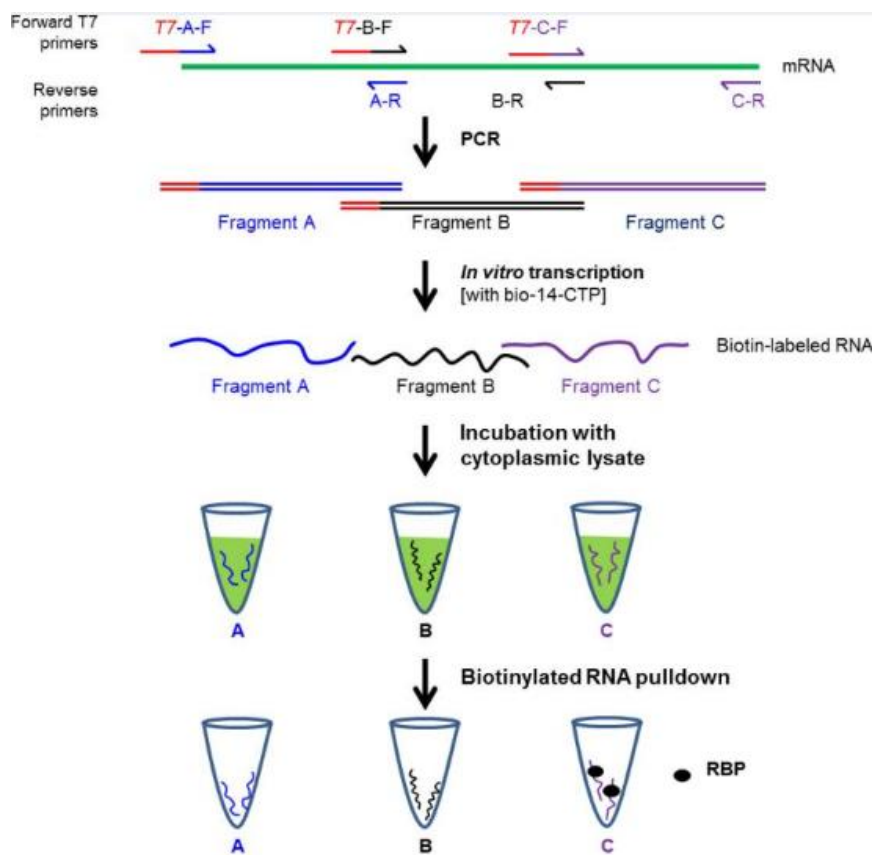
Esquema 3. Citometría de flujo

Ensayos de interacción RNA-proteína (pull down) de LncRNAs

El ARN biotinilado de *LINC02761*, *AP002340.1* y *Walras* fue sintetizado a partir de fragmentos de PCR usando primers que amplificaban sentido 5`-3` de la correspondiente secuencia, conteniendo la secuencia promotora de polimerasa T7. El ADN producido se purificó usando MaxiScript T7 kit (Ambion) se sintetizaron los transcrito biotinilados siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante. Lisados celulares de AC16 y HL1 , 500ng por reacción, fueron incubados con 1 µg del RNA biotinilado correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente usando

Dynabeads acopladas a Streptavidina (Invitrogen) los complejos formados en los pasos previos fueron aislados y posteriormente analizados mediante espectrofotometría de masas. Los complejos fueron cargados dentro de una trampa para péptidos y eluidos en una columna PicoFrit de fase reversa (New Objective, Woburn, MA, USA). A continuación, estos péptidos fueron pulverizados e ionizados, usando Nanospray Flex Ion Source ES071 (Thermo Scientific) dentro del espectrofotómetro de masas. El análisis de las muestras se realizó en un espectrofotómetro de masas híbrido cuadrupolo-Osbitrap Thermo Scientific Q-Exactive y un sistema Thermo Dionex Ultimate 3000 RSLCnano, a continuación, usando la plataforma Thermo Proteome Discoverer 1.4.1 se identificaron las proteínas presentes en las muestras.

Para el análisis y comparación de proteínas que interactúan con nuestros lncRNA de interés, y los procesos en los que actúan, se usó el software on line Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), en el cual se introdujeron las proteínas con las que interactuaba cada lncRNA, realizando una comparación entre ellas.



Esquema 4. Ensayo Pull down (Imagen tomada de Panda *et al*; 2017)

Análisis de funcionales y de interacción de proteínas

Las interacciones proteína-proteína fueron analizadas usando la plataforma STRING (version 12.0; Szklarczyk et al., 2023) para determinar la red de interacción entre las proteínas deseadas. El valor mínimo de interacción requerido se estableció en un nivel de 0.9. Además, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional usando la herramienta de base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID) (Sherman et al., 2022), con el objetivo de establecer los términos y rutas de ontología genética (GO) de nuestro conjunto de datos. Se determinaron los procesos biológicos (BP), funciones moleculares (MF) y componentes celulares (CC) más importantes para cada conjunto de genes.

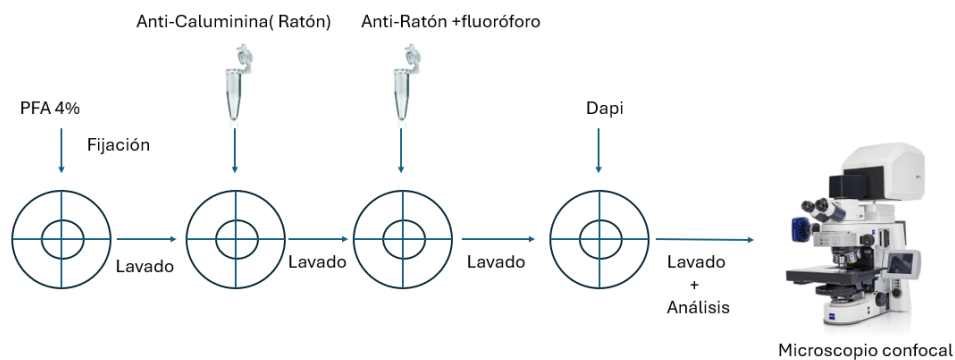
Análisis de inmunoprecipitación de RNA (RIP)

Células HL1 y AC16 fueron lisadas con el tampón PEB (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40) durante 10 minutos en hielo, seguido por una centrifugación a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se incubó el sobrenadante con perlas de proteína Sepharosa A (Abcam) recubiertas de anticuerpos frente a Calumina o IGG como control (Abcam) durante 2 horas a 4°C, respectivamente. Las perlas se lavaron con tampón NT2 (Tris-HCl. 5 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, NP-40 al 0,05 %). Los complejos proteicos se incubaron con 20 unidades de DNasa I durante 15 minutos a 37 °C. En este paso, se aisló una alícuota de cada reacción para su validación mediante Western Blot. Posteriormente, se incubaron adicionalmente con SDS al 0,1 %/0,5 mg/ml de proteinasa K durante 30 min a 55°C, para eliminar el ADN y las proteínas, respectivamente. El ARN aislado se analizó mediante RT-qPCR siguiendo el protocolo descrito en el trabajo de García-Padilla y colaboradores de 2022 (García-Padilla *et al*; 2022).

Análisis inmunohistoquímico mediante microscopía confocal

Las células fueron sembradas en placas de cultivo celular de cuatro pocillos especiales para su uso en microscopía confocal (D35C4-20-1.5-N/Cellvis). Una vez tratadas, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con PFA al 4% en PBS durante 10 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos de PFA. A continuación, las células se permeabilizaron usando una solución compuesta por NH₄CL

50 nM, Tritón 100X 0,2%, diluido en PBS durante 10 minutos, seguido por dos lavados de PBS de 5 minutos. El siguiente paso fue el bloqueo de uniones inespecíficas con una solución de bloqueo compuesta por Gelatina al 0,2 % en PBS durante 10 minutos, seguido por dos lavados con PBS de 5 minutos. A continuación, las células fueron incubadas con un anticuerpo primario frente a CALU (sc-271357/Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, pasado este tiempo se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos y expuestas a un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo 546 (A11030/Life technologies) diluido en solución bloqueadora durante 30 minutos. Finalmente, las células se lavaron cuatro veces con PBS durante 10 minutos, se marcó el núcleo con DAPI (Merck/D9542) durante 10 minutos, se realizaron dos lavados de 5 minutos y finalmente se mantuvieron las células en PBS hasta su análisis mediante microscopía confocal usando los láseres apropiados.



Esquema 5. Microscopía confocal

Análisis mediante hibridación *in situ* de la distribución tisular de *Walras*

Los embriones E14,5 se fijados durante una noche con paraformaldehído al 4% en PBS. Después de la fijación, las muestras fueron deshidratadas mediante exposición a concentraciones crecientes de alcohol acabando con un paso de exposición a 1- butanol, para a continuación ser incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones de tejido en parafina de 10 μ M de grosor y depositadas en cristales tratados con 3-aminopropyltriethoxysilane. Sondas de RNA fueron generadas usando polimerasas T7 y SP6 en presencia de nucleótidos marcados con digoxigenina (DIG RNA Labeling Mix Roche/11277073910) a partir de pGEM-t EASY VECTOR (Promega) que contenía al lncRNA *Walras*, siendo este generado siguiendo las indicaciones del fabricante. También

se usaron como control *Mlc2v* y *Mlc2a* realizando la hibridación como se describió previamente en Franco et al. (1999).

Western Blot (WB)

Células HL1 transfectadas con plásmido *Gm44934/Walras*-IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406), el plásmido sin construcción IRES-GFP-pcDNA3.1(Addgene/51406) y *Gm44934/Walras* siRNA (Sigma, Aldrich, Múnich, Germany) se lisaron con Buffer PEB (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40), analizando la concentración de proteínas usando el *kit Pierce BCA protein assay kit* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Se procedió a cargar cantidades iguales de proteína de cada muestra (20 ng), siendo sometidas a electroforesis en gel al 8-12% SDS-PAGE continuación se realizó su transferencia a una membrana de nitrocelulosa, la cual fue posteriormente expuesta a un anticuerpo monoclonal (caspasa 3 diluido 1:1000 (9662S/Cell Signaling, Beverly, MA, USA) y a un anticuerpo monoclonal frente a β -tubulina–Peroxidasa durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después de esta incubación, se procedió a lavar la membrana, siendo expuesta a continuación a la incubación con anticuerpo secundario frente a ratón diluido 1:1000 (sc-2057/ Santa Cruz Biotechnology) o frente a IgG de conejo unido a HRP diluido 1:1000 (sc-2054/ Santa Cruz Biotechnology), respectivamente. Tras el lavado de la membrana, se procedió visualizar las bandas inmunorreactivas usando *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las bandas inmunorreactivas fueron analizadas usando lab analysis software imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La densidad de cada banda fue evaluada con Image Lab analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). β -Actina y Gapdh fueron usados como control de carga y los valores fueron normalizados frente a los valores obtenidos en las muestras control.

Análisis de la función mitocondrial mediante Seahorse

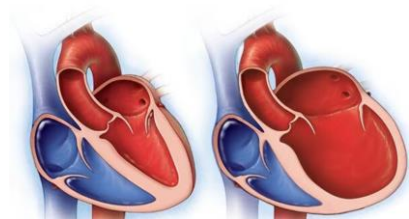
Células HL1 infectadas con *Ad-Walras*-GFP o *Ad-Scrambled*-GFP (Vectorbuilding) fueron sembradas en cada pocillo de una placa Seahorse XF-96. Se usó Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para medir la ratio de consumición de oxígeno (OCR) en células HL1. Tras 24 horas tras la infección, las células fueron incubadas durante una hora con XF Assay Medium (Seahorse

Bioscience, Santa Clara, CA, USA) más 5 mM glucosa para realizar un estudio del perfil bioenergético típico. El OCR de la respiración basal fue inicialmente medido, seguido de la exposición a 1 μ M de oligomycina (un inhibidor de la ATP sintasa), permitiendo de esta manera la cuantificación de la cantidad de oxígeno consumida durante la síntesis de ATP, el flujo de protones (H^+), y otras oxidasas. A continuación, se añadió a una concentración de 1 μ M el desacoplador de carboxilo 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazona (FCCP), con el objetivo de cuantificar la capacidad máxima respiratoria, añadiéndose en el siguiente paso 1 μ M de rotenona y 1 μ M de antimycina A, una combinación de inhibidores del complejo I y III de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC), eliminando por completo el consumo de oxígeno mitocondrial. Los datos de OCR fueron calculados usando Wave software v. 2.6.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), siendo normalizados con relación al marcaje nuclear.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó aplicando el test t-Student (Bonet et al., 2015; Dueñas et al., 2020, Garcia-Padilla et al., 2022). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, USA). Los niveles de significación fueron indicados mediante el valor de p, siendo estadísticamente significativo a partir de un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS



5.Resultados

5.1 Perfil de expresión de distintos lncRNAs en modelos de cardiomiopatía dilatada

Con el fin de determinar el posible papel que desempeñan *Walar*, *Wala*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en la cardiomiopatía dilatada, se procedió al análisis de su expresión mediante RT-qPCR en muestras de tejido ventricular cardiaco correspondiente a machos y hembras, respectivamente, provenientes de dos modelos de ratones que presentan dicha patología - *Lmna249* y *LmnaCRE* -.

En ratones *Lmna249* se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de cuatro de los cinco lncRNAs estudiados -*Walar*, *Wala*, *Walrad* y *Walras*- en machos (figura 8A), mientras que en las hembras se constató una disminución en la expresión de todos ellos (Imagen 8 B).

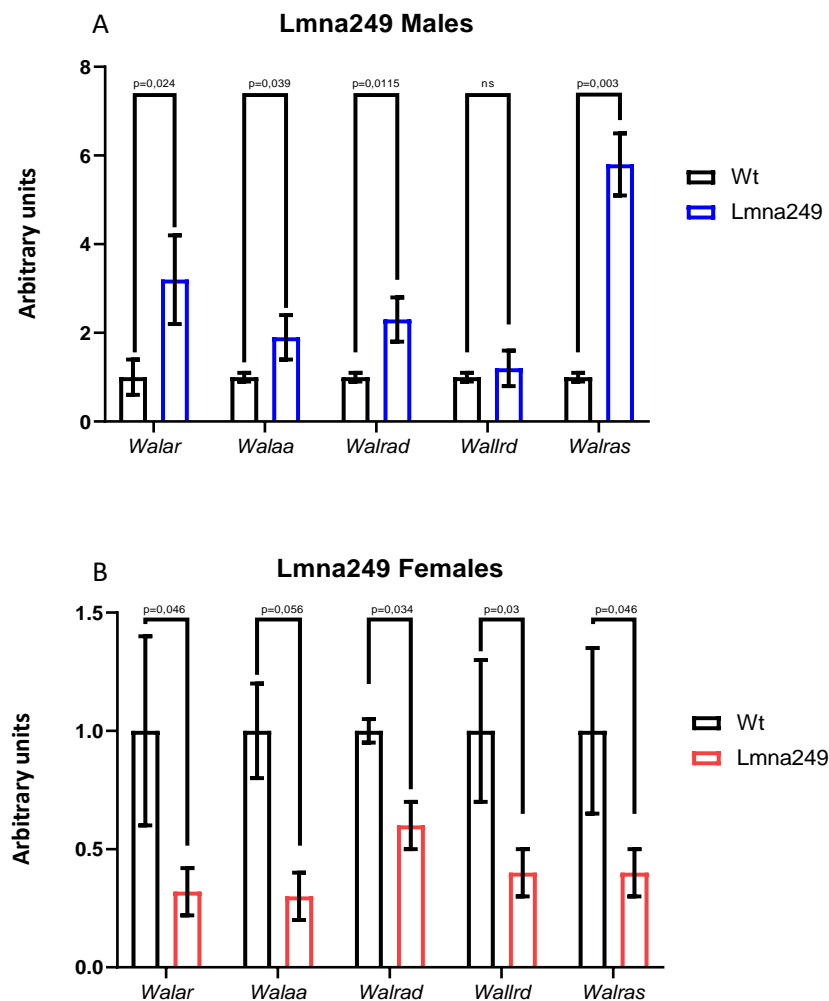


Figura 8. Perfil de expresión, analizado mediante RT-qPCR, de los lncRNAs *Walar*, *Wala*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en muestras de machos (A) y hembras (B) del modelo de ratón de cardiomiopatía dilatada Lmna249. En machos se obtuvieron diferencias para *Walar*($p=0,024$), *Wala* ($p=0,039$), *Walrad*($p=0,0115$) y *Walras*($p=0,003$), en hembras se observó diferencias para *Walar*($p=0,046$), *Wala* ($p=0,0056$), *Walrad*($p=0,034$), *Wallrd*($p=0,03$) y *Walras*($p=0,045$).

Así mismo, para determinar si la desregulación observada tanto en los machos como en las hembras era debida a la mutación puntual de la lamina, presente en el modelo Lmna 249, o por el contrario era resultado de la pérdida de función de esta en los cardiomiocitos, se llevó a cabo el análisis de expresión de los lncRNAs descritos anteriormente en un modelo de ratón LmnaCRE.

El análisis de expresión en los ratones LmnaCRE reveló un incremento en la expresión de, *Wala*, *Walrad* y *Walras* en ratones macho, no así de *Walar* y *Wallrd* (Figura 9 A). De forma similar a lo observado en el anterior modelo, en los ratones hembra la expresión de todos los lncRNAs analizados se encontraba significativamente disminuida (Figura 9 B).

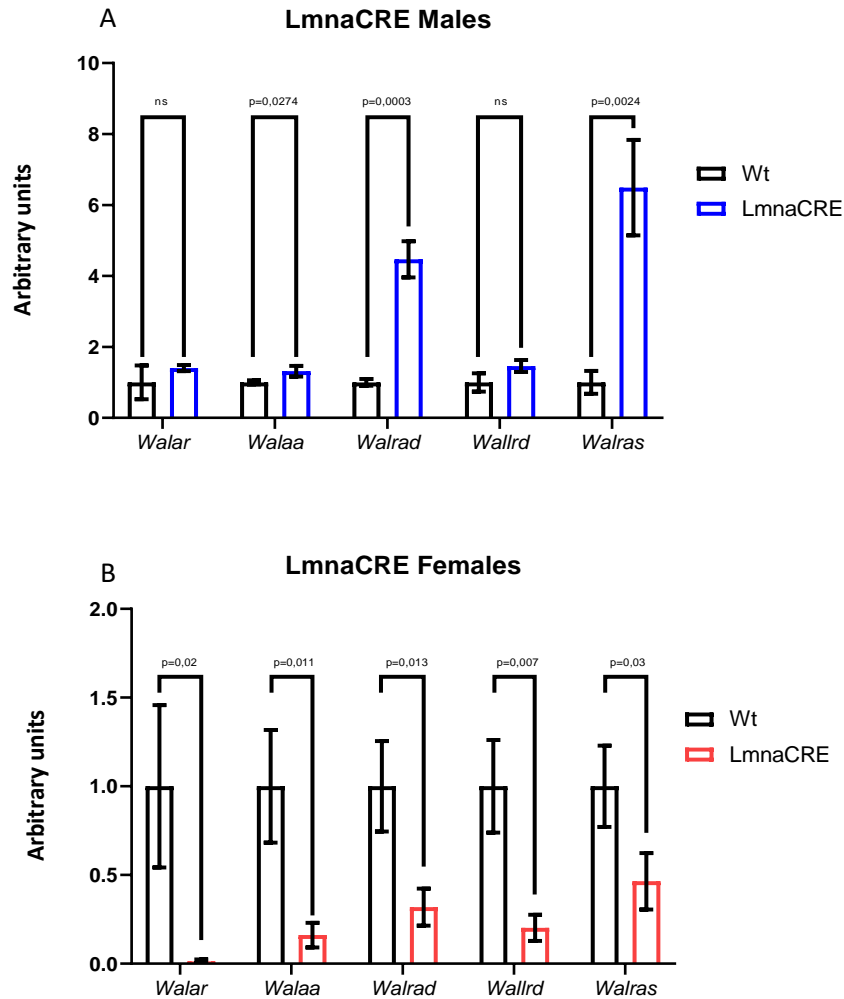


Figura 9. Perfil de expresión, analizado mediante RT-qPCR, de los LncRnas *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en muestras de machos (A) y hembras (B) del modelo de ratón de cardiopatía dilatada LmnaCRE. En machos se obtuvieron diferencias significativas para *Walar* ($p=0,024$), *Walaa* ($p=0,039$), *Walrad* ($p=0,0115$) y *Walras* ($p=0,003$). Por otro lado, en el caso de las hembras se determinaron diferencias para *Walar* ($p=0,046$), *Walaa* ($p=0,0056$), *Walrad* ($p=0,034$), *Wallrd* ($p=0,03$) y *Walras* ($p=0,045$).

Por tanto, los resultados obtenidos muestran una desregulación en la expresión de los lncRNAs estudiados en los modelos de ratón de cardiopatía dilatada analizados. Del mismo modo, se identificó un incremento de la mayoría de ellos en las muestras provenientes de los machos y una reducción de todos ellos en aquellas muestras provenientes de las hembras, sugiriendo que la desregulación de dichos lncRNAs observada puede ser debida o dependiente del sexo.

5.2 Perfil de expresión de distintos lncRNAs en un modelo de cardiomiopatía hipertrófica

Con el objetivo de determinar si las diferencias en la expresión de estos lncRNAs tanto en machos y hembras observadas en los modelos previamente descritos es propia de la cardiomiopatía dilatada, o por el contrario se puede identificar en otras cardiomiopatías, se decidió examinar la expresión de este subconjunto de lncRNAs en un modelo de cardiomiopatía hipertrófica de ratón – Mybpc3-. En dicho modelo, se observó un aumento en la expresión de *Walar*, *Wala*, *Walrad* y *Walras* en el caso de los machos (Figura 10 A), mientras que en el caso de los ratones hembra la expresión de todos ellos estaba reducida (Figura 10 B).

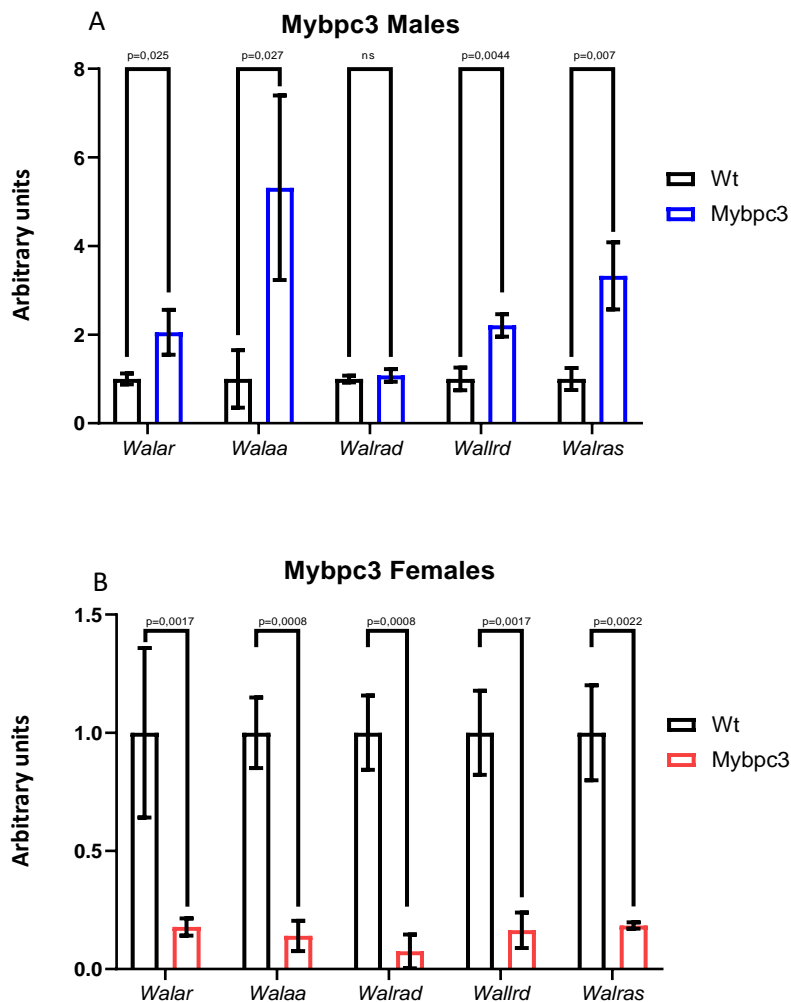


Figura 10. Perfil de expresión, analizado mediante q-PCR, de los lncRNAs *Walar*, *Wala*, *Walrad*, *Walrd* y *Walras* en muestras de machos (A) y hembras (B) del modelo de ratón de cardiomiopatía hipertrófica Mybpc3. En machos se obtuvieron diferencias para *Walar*($p=0,025$), *Wala* ($p=0,027$), *Walrad*($p=0,0044$)

y *Walras*($p=0,007$). En el caso de las hembras se pueden observar diferencias para *Walar*($p=0,017$), *Wala* ($p=0,0008$), *Walrad*($p=0,0008$), *Wallrd*($p=0,0017$) y *Walras*($p=0,0022$).

5.3 Papel regulador de la presencia de estrógenos (β -estradiol) sobre los niveles de expresión de los lncRNAs de interés

Dadas las diferencias observadas en la desregulación de la expresión de estos lncRNAs en los distintos modelos estudiados, se planteó que dichos lncRNAs podrían estar regulados por distintas hormonas femeninas como el β -estradiol. Los resultados observados muestran una reducción en la expresión de estos lncRNAs en HL1 tratadas con esta hormona (Figura 11).

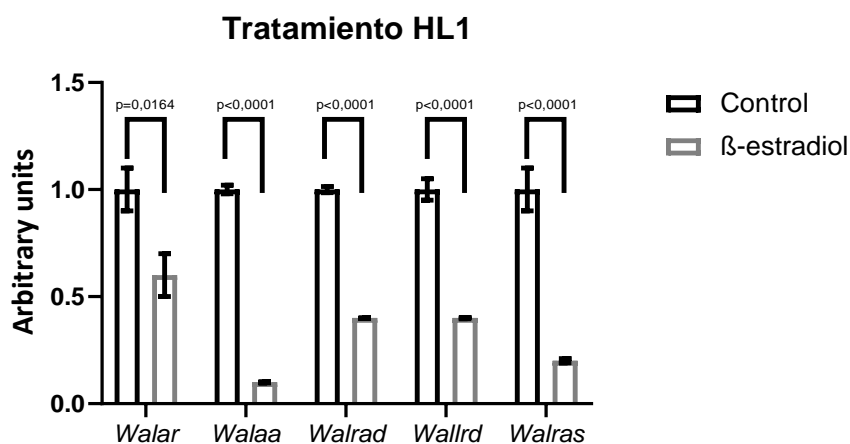


Figura 11. Modulación de la presencia de los lncRNAs de interés en HL1 expuestas a β -estradiol. Se puede observar una reducción de los niveles de expresión de *Walar* ($p=0,0164$), *Wala* ($p<0,0001$), *Walrad* ($p<0,0001$), *Wallrd* ($p<0,0001$) y *Walras* ($p<0,0001$).

En conjunto, los datos previos muestran que todos los lncRNAs estudiados se encuentran desregulados en las distintas cardiomiopatías analizadas. De igual manera, indican que la desregulación observada en los modelos de cardiomiopatía dilatada e hipertrófica analizados pueden ser dependientes del contexto hormonal.

5.4 Perfil de expresión de los lncRNAs de interés en un modelo de Infarto agudo de Miocardio (IM)

A continuación, se analizó si este subconjunto de lncRNAs se encontraban también modulados por procesos patológicos cardíacos agudos como es el caso del infarto agudo de miocardio. Para ello, se determinaron sus niveles de expresión en un modelo de ratón

de infarto de miocardio, analizando la zona infartada (IZ), el borde de la zona infartada (BZ) y el área remota respecto a la zona infartada en el ventrículo izquierdo (RZ), sin poder observarse diferencias significativas entre los machos(A) y hembras(B). Sin embargo, la expresión de *Walar* y *Walrad* se encontraba incrementada en la zona infartada con respecto al área remota respecto a la zona infartada en el ventrículo izquierdo en el caso de las hembras (Figura 12), sugiriendo un posible papel funcional de estos lncRNAs en este contexto.

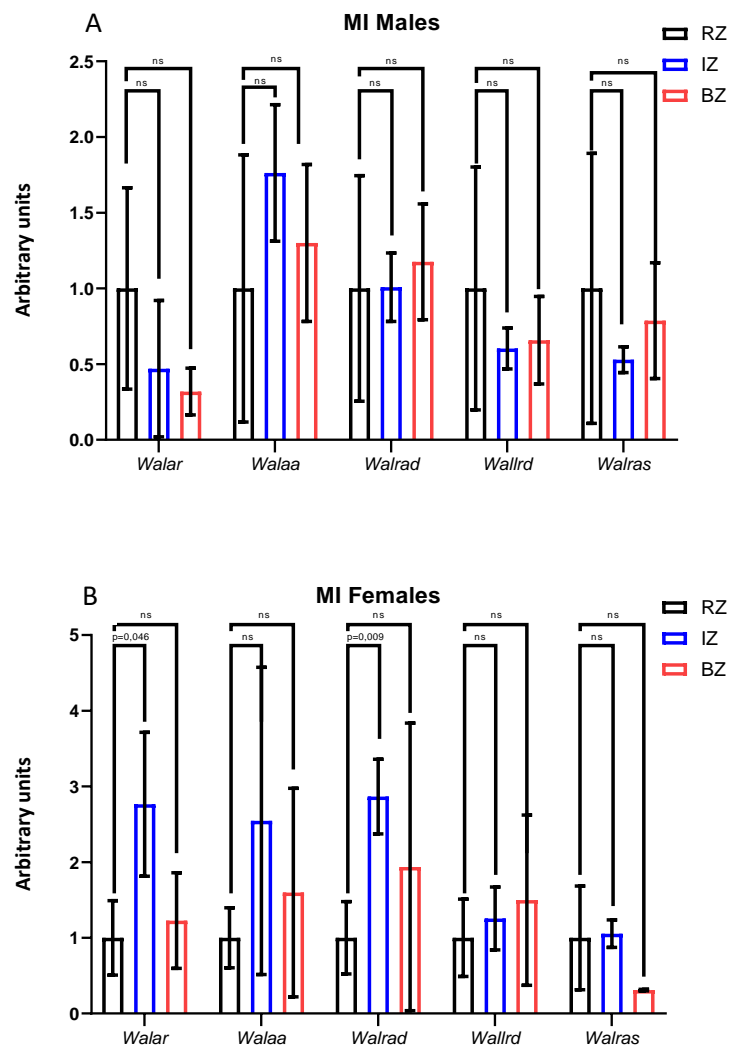


Figura 12. Perfil de expresión, analizado mediante q-PCR, de los lncRNAs *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en muestras de machos (A) y hembras (B) del modelo de ratón de infarto agudo de miocardio siendo las zonas estudiadas la zona infartada (IZ), la zona borde del infarto (BZ) y el área remota respecto a la zona infartada en el ventrículo izquierdo. En el caso de los machos no se observan diferencias entre las zonas de estudio. Para las hembras, solo se observan diferencias para *Walar* y *Walrad* en IZ ($p=0,046$ y $p=0,009$ respectivamente) en comparación a RZ.

Teniendo en cuenta todos los datos obtenidos, se puede determinar la existencia de una desregulación de *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* tanto en los distintos modelos de cardiomiopatía dilatada como en cardiomiopatía hipertrófica estudiados, estando esta desregulación caracterizada por un patrón opuesto de expresión entre machos – aumentada- y hembras- disminuida-, y siendo esto último explicado por la acción sobre su expresión de las hormonas femeninas. Para finalizar, se ha podido establecer que la desregulación observada es propia de cardiomiopatías y no de procesos agudos como en infarto de miocardio al no estar presente en este.

5.5 Niveles de expresión de *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en líneas celulares establecidas

Distintos autores han puesto de manifiesto que tanto en la cardiomiopatía dilatada como en la cardiomiopatía hipertrófica se observa una severa alteración en la homeostasis de los cardiomiocitos, pudiendo ser tanto causa como consecuencia de dichas patologías. Para determinar si estos lncRNAs se expresaban de forma preferente en cardiomiocitos o por el contrario se expresan en otros tipos celulares cardiacos, se analizó mediante qPCR la expresión de estos en distintas líneas celulares cardiacas – HL1 (cardiomiocitos), MEC1 (células epicárdicas embrionarias) y MEVECs (células endocárdicas embrionarias). Los datos obtenidos nos revelan una expresión preferencial en cardiomiocitos en el caso de *Walras* y *Walar*, siendo en el caso de *Wallrd* y *Walaa* preferentemente expresados en células endocárdicas y determinándose una expresión ubicua de *Walrad* en los tres tipos celulares estudiados (Figura 13).

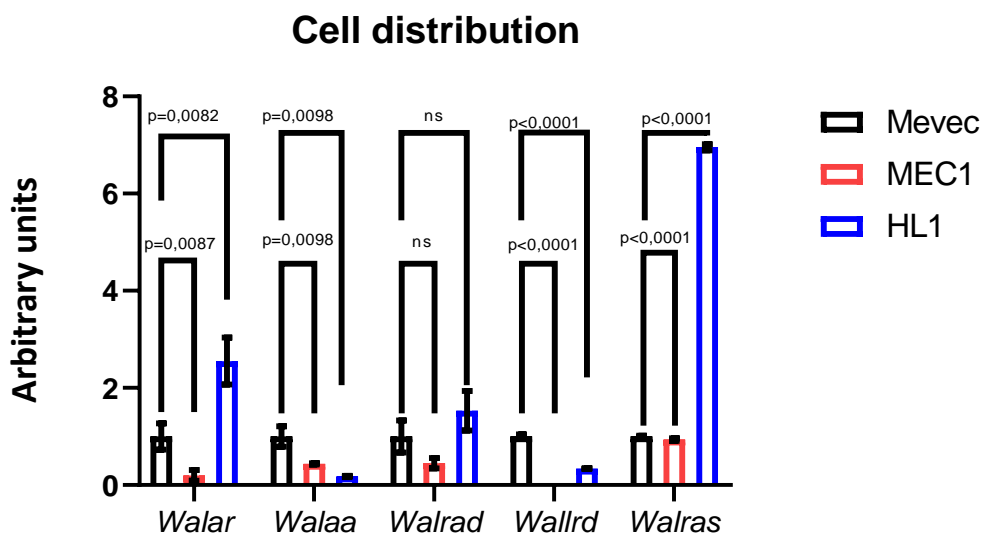


Figura 13. Perfil de expresión, analizado mediante q-PCR, de los lncRNAs *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* en cardiomiocitos atriales (HL1), células endocárdicas (Mevec) y células epicárdicas (Mec). Se observó como *Walras* presentaba una mayor expresión en HL1 ($p = 0,0001$), al igual que *Walar* ($p=0,0082$), *Wallrd* se expresó principalmente en Mevec respecto a Mec ($p<0,0001$) y HL1 ($p<0,0001$), *Walaa* presentó una mayor expresión en Mevec en comparación a Mec ($p=0,0098$) y HL1 ($p=0,0024$), mientras que *Walrad* mostró una distribución ubicua en los tres tipos celulares.

5.6 Análisis mediante hibridación *in situ* en cortes histológicos de corazón de ratón E14,5 de la expresión de *Walras*

Debido a la expresión preferencial de *Walras* en cardiomiocitos, y presentando una desregulación marcada en los modelos de cardiomiopatía estudiados, se decidió estudiar con mayor profundidad la expresión tisular de *Walras* mediante hibridación *in situ* en cortes histológicos de ratón en estadio E14,5. En ventrículos, se pudo observar su amplia expresión en el corazón, especialmente en el miocardio. (Figura 14 A-H)

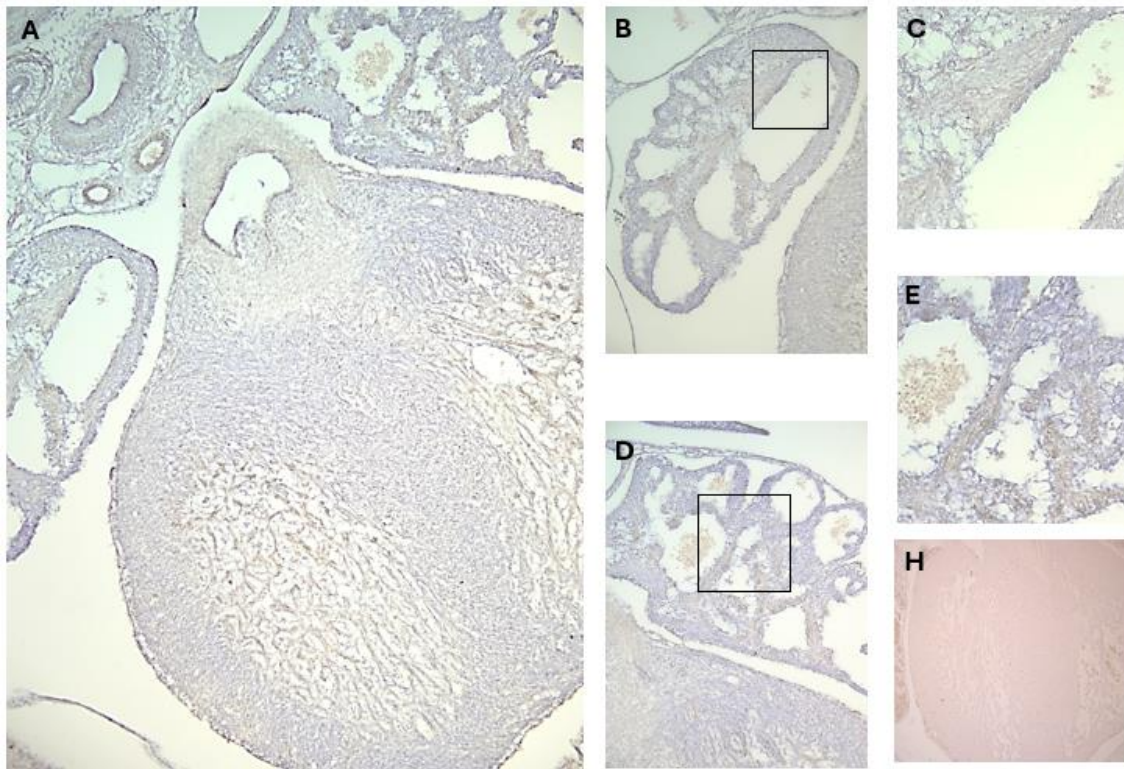


Figura 14. Hibridación *in situ* corte histológico embrión de ratón E14,5. A) Sección corazón completo. B) Aurícula derecha. C) Ampliación Aurícula derecha. D) Aurícula izquierda. E) Ampliación aurícula derecha. H) Control negativo

5.7 Modulación de la vía UPR en el modelo LmnaCRE

En los últimos años ha crecido la necesidad de identificar los posibles mecanismos subyacentes en la progresión de distintas patologías cardíacas. En el caso de la cardiomiopatía dilata se ha identificado al estrés del retículo endoplasmático y la vía UPR como posibles reguladores de la progresión de esta patología, al regular la apoptosis de los cardiomiocitos y su homeostasis (Al-Yacoub et al., 2021; Pietrafesa et al., 2023). Con el fin de explorar la regulación de esta vía y como se puede ver afectada su incidencia por las diferencias entre sexos, se decidió comprobar la expresión de tres de las principales moléculas de activación de esta vía - *Atf6*, *Ire1* y *Perk*- en ratones LmnaCRE. Se observó como la expresión de *Atf6* e *Ire1* se encontraba reducida en hembras LmnaCRE, mientras que *Perk* se encontraba aumentado, sugiriendo una mayor activación de la vía UPR en los ratones macho LmnaCRE y por ende un mayor estrés del retículo endoplasmático (Figura 15).

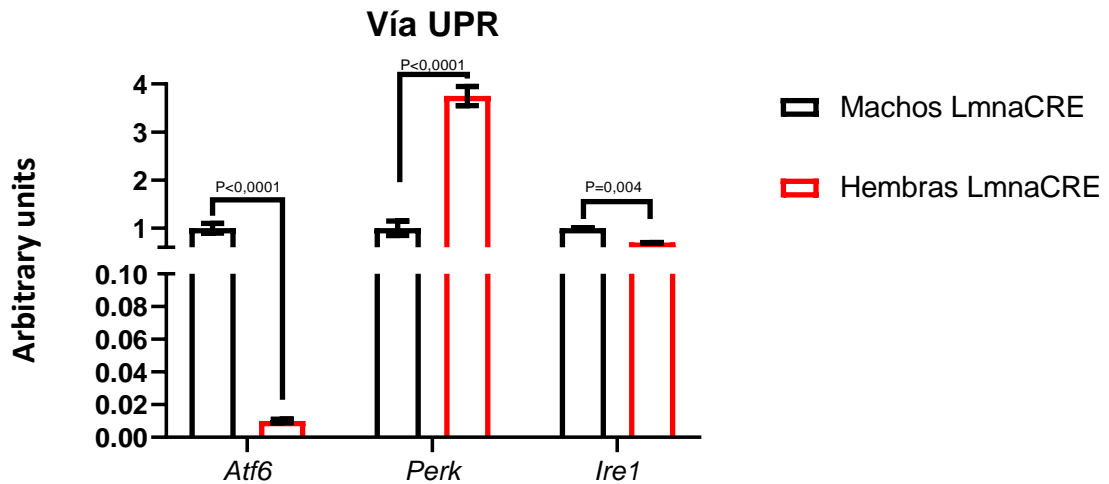


Figura 15. Expresión de *ATF6*, *PERK* e *IRE1* en el modelo de ratón LmnaCRE: Se determinó la expresión disminuida de *ATF6* ($p < 0,0001$) e *IRE1* ($p = 0,004$) en hembras y la expresión aumentada de *Perk* ($p < 0,0001$)

5.8 Efectos de la inducción de estrés del retículo endoplasmático (ERS) en los niveles de *Walras*

Debido a la expresión enriquecida de *Walras* en cardiomiocitos, su expresión diferencial en hembras y machos en modelos de cardiomiopatía dilatada e hipertrófica en ratón y la mayor activación de la vía UPR en los ratones macho, se decidió determinar la posible participación de *Walras* en la vía de señalización UPR y en el estrés del retículo endoplasmático. En primer lugar, se determinó si la expresión de *Walras* podría ser modulada por la activación del ERS. Para ello se trataron células HL1 con tunamicina (Merck/654380), un inductor establecido del ERS (Serrano-Negrón *et al.*, 2018; Abhari *et al.*, 2019). Se observó una regulación al alza para este lncRNA, señalando un posible papel en esta vía de señalización (Figura 16).

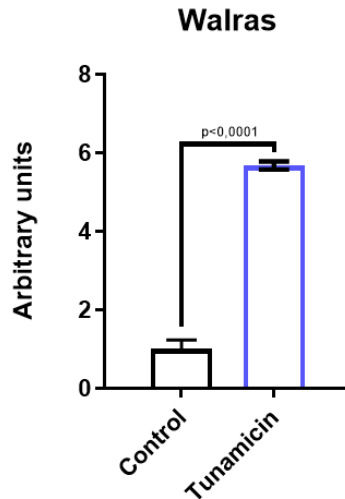


Figura 16. Determinación de los niveles de *Walras* tras la inducción de ERS. Se identificó un aumento de la presencia de *Walras* ($p < 0,0001$) en HL1 expuestas a tunamicina.

5.9 Papel de *Walras* en la vía UPR

A continuación, se realizó un ensayo de ganancia y pérdida de función para determinar el posible papel de *Walras* en la vía UPR. Los datos obtenidos mostraron que la ganancia de función de *Walras* provoca un aumento en la expresión de *Atf6* e *Ire1* acompañado por una reducción en la expresión de *Atf4*, *Bcl-2* y *Bip*, desempeñando estos últimos genes una función anti-apoptótica. Por el contrario, la pérdida de función de *Walras* produjo una reducción en la expresión de *Atf6* e *Ire1* y un aumento de *Atf4*, *Bcl-2* y *Bip* (Figura 17).

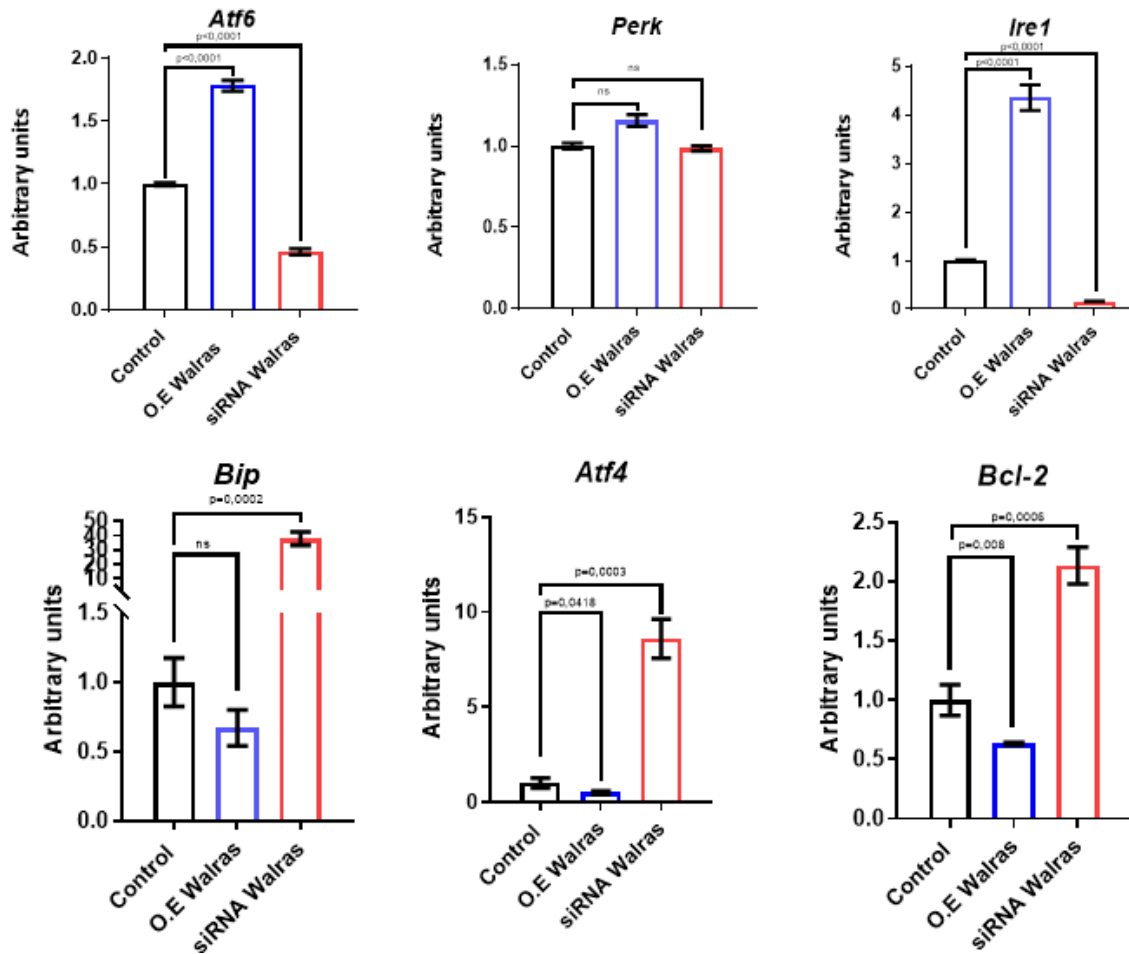


Figura 17. Análisis del efecto de la ganancia (O.E. *Walras*) y pérdida de función de *Walras* (siRNA *Walras*) en la vía UPR. Para la ganancia de función se observa un incremento en la expresión de *Atf6* ($p < 0,0001$) e *Ire1* ($p < 0,0001$) y una reducción de *Atf4* ($p = 0,0418$) y *Bcl2* ($p = 0,008$). En la pérdida de función se observa una reducción de *Atf6* ($p < 0,0001$) e *Ire1* ($p < 0,0001$) y un aumento de *Bip* ($p = 0,0002$), *Atf4* ($p = 0,0003$) y *Bcl-2* ($p = 0,0006$).

Dado que la sobreexpresión de *Walras* conduce a una represión de tres genes antiapoptóticos como son *Atf4*, *Bip* y *Bcl-2*, se determinó si dicha sobreexpresión conducía a una mayor o menor viabilidad celular. Ensayos de viabilidad mediante citometría de flujo revelaron que mientras la sobreexpresión de *Walras* reducía considerablemente el número de células vivas, la inhibición de dicho lncRNA resultaba en un aumento del número de células viables (Figura 18).

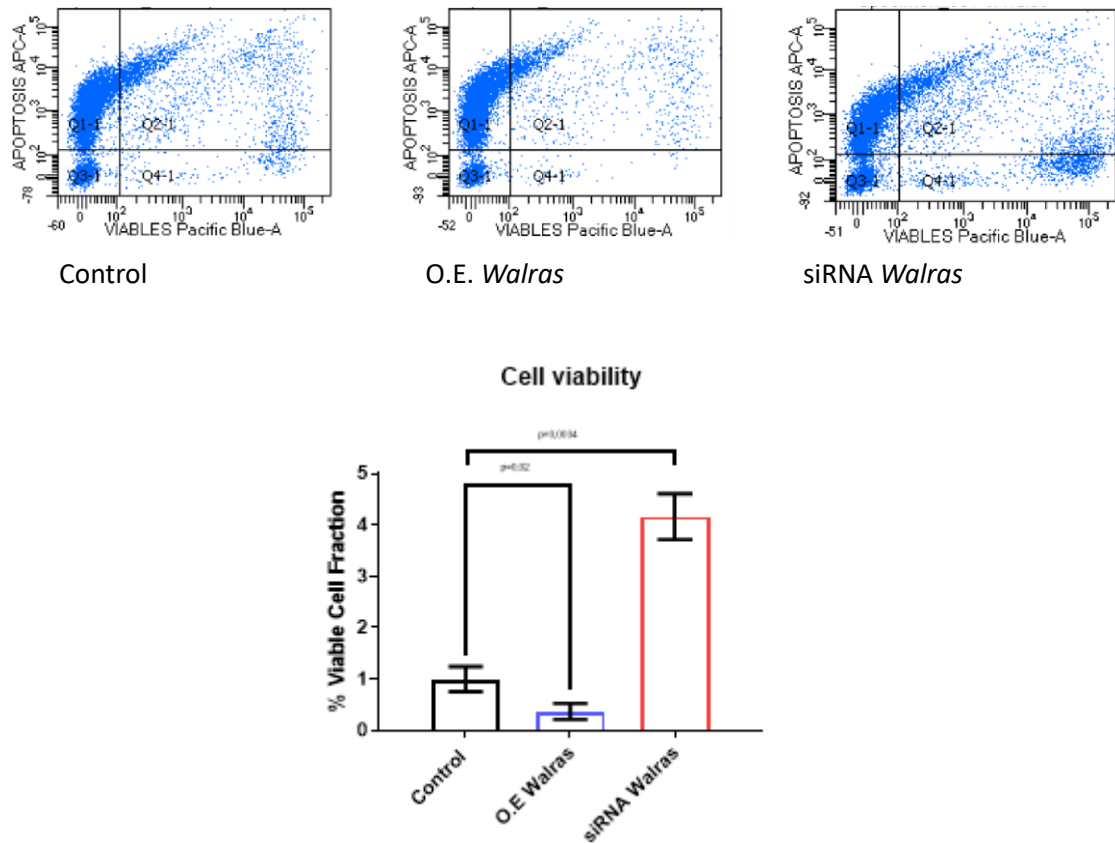


Figura 18. Análisis del efecto de la ganancia (O.E. Walras) y pérdida de función de *Walras* (siRNA *Walras*) sobre la viabilidad celular. Se observó una reducción en la viabilidad celular ($p=0,02$) y un aumento ($p=0,0004$) en la ganancia y pérdida de función respectivamente.

Así mismo, se estudió mediante Western Blot (WB), la expresión de *Caspasa 3*, un marcador de apoptosis, en células que sobre expresaban *Walras* y en aquellas en las que estaba inhibido, observándose un aumento de *Caspasa 3* (*CASP3*) en aquellas que lo sobre expresaban (Figura 19).

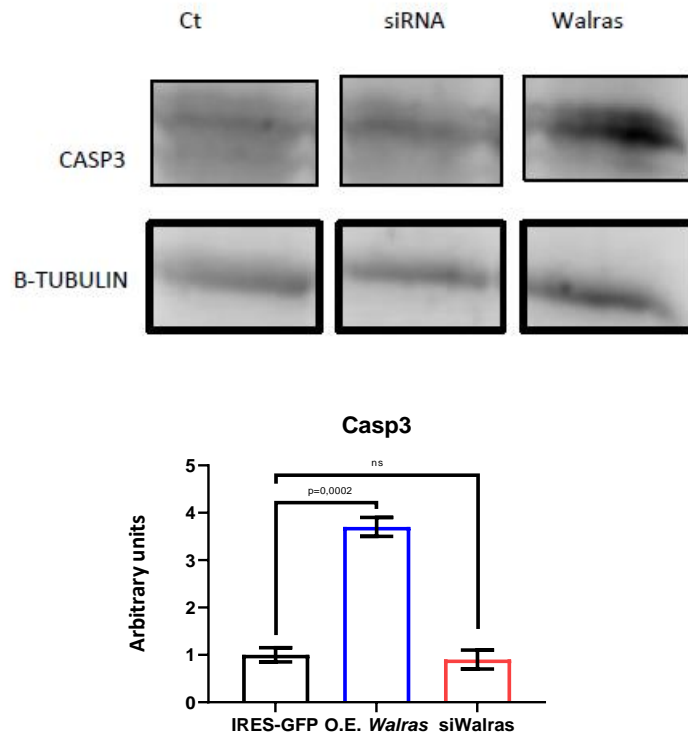


Figura 19. Estudio mediante WB de los niveles de *caspasa 3* en células en las que se encontraba sobre expresado *Walras* (O.E. *Walras*) y en aquellas en las que se encontraba inhibido (siRNA *Walras*). Se observó un aumento en la presencia de *Caspasa 3* en la ganancia de función ($p=0,0002$).

Una vez observada la alteración de viabilidad celular ejercida por *Walras*, se decidió identificar el mecanismo subyacente mediante el cual realizaba esta acción. Para ello y usando inmunoprecipitación de RNA (RIP), se analizó la posible interacción física entre *Walras* y Caluminina (CALU), una proteína descrita como factor anti-apoptótico en el contexto de la vía UPR. Dicha posible interacción está basada en datos previos de nuestro grupo en los que se identificó CALU como posible proteína asociada a *Walras* mediante técnicas de pulldown-MS (García-Padilla et al.,2022). Los resultados obtenidos indican la existencia de esta interacción física entre este lncRNA y CALU (Figura 20).

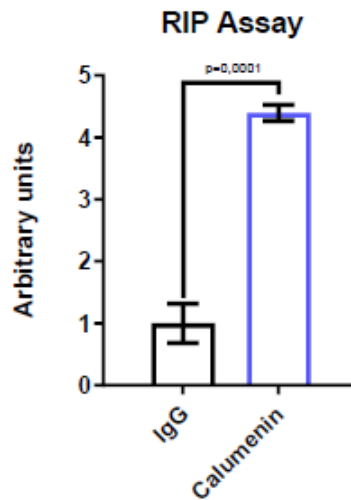


Figura 20. Ensayo de inmunoprecipitación de ARN para *Walras*. Se observa un enriquecimiento de *Caluminina* frente al control ($p=0,0001$).

Basándonos en la identificación de una interacción física directa entre *Walras* y CALU (García-Padilla *et al.*,2022), se procedió a estudiar si esta interacción podría ejercer un papel regulador la presencia de dichas proteínas. Análisis inmunohistoquímicos mostraron que la sobreexpresión de *Walras* se traducía en una menor presencia de CALU, observándose el patrón opuesto en el caso de su inhibición, sugiriendo que la interacción entre *Walras* y CALU facilita la degradación de esta proteína. Por ello, se realizó un estudio de rescate mediante el tratamiento de células HL1, tras la sobreexpresión de *Walras*, con un inhibidor conocido de la ubiquitinación conocido como UBA1, con el objetivo de comprobar si la alteración de la ubiquitinación se traducía en la reversión de los efectos de *Walras*. En este estudio, se observó que los niveles de CALU se recuperaban tras la alteración de la ubiquitinación, obteniéndose niveles similares a la inhibición de *Walras* (Figura 21).

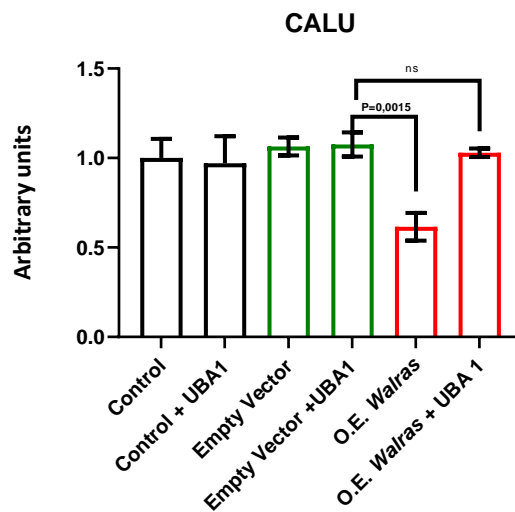
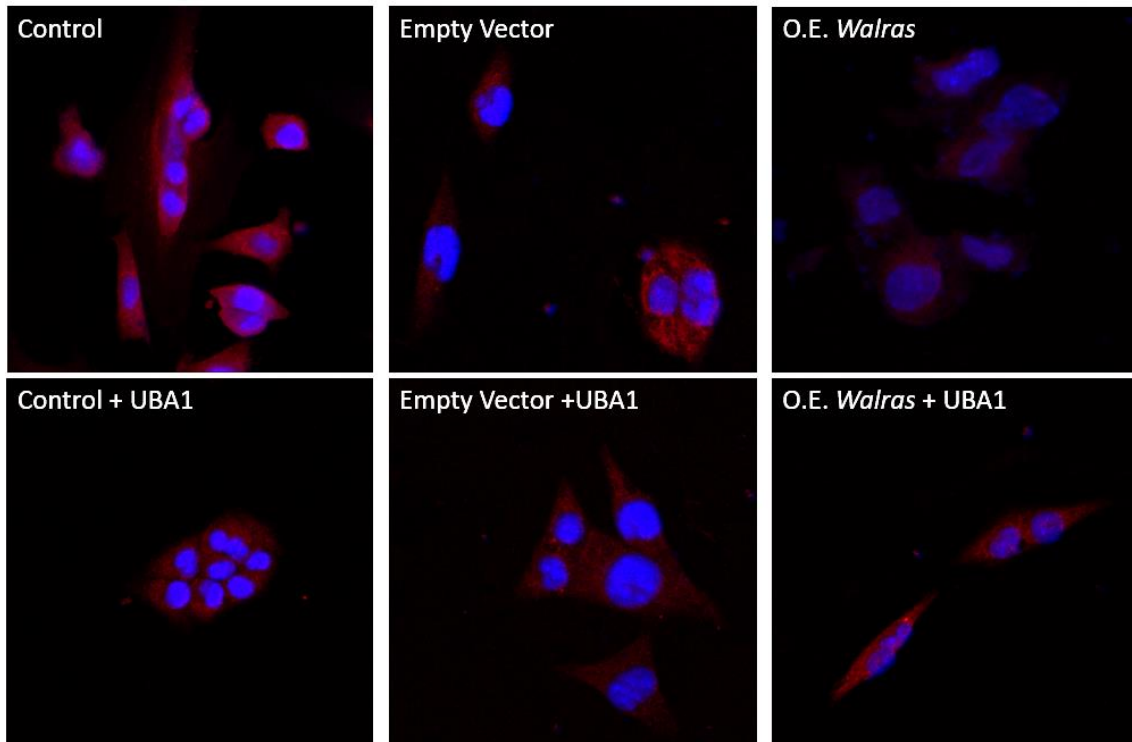


Figura 21: Análisis inmunohistoquímico de la presencia de *CALU* (marcada en rojo) en células HL1. Los niveles de Caluminina se ven reducidos en el caso de las células que sobre expresaban *Walras* (O.E. *Walras*), viéndose revertida esta alteración en el caso del tratamiento con UBA1 tras la ganancia de función de este lncRNA.

A continuación, y tras establecer el posible efecto de *Walras* sobre *CALU*, se procedió al análisis de la expresión de *Bip*, *Bcl-2* y *Caluminina* en machos y hembras del modelo de ratón de cardiomiopatía dilatada *Lmna*CRE. Se observó una expresión aumentada de *Bcl-2* y *Caluminina* en hembras comparadas con machos, sugiriendo una posible reducción

de la apoptosis en el caso de las hembras, teniendo como resultado en una mejor función cardíaca (Figura 22).

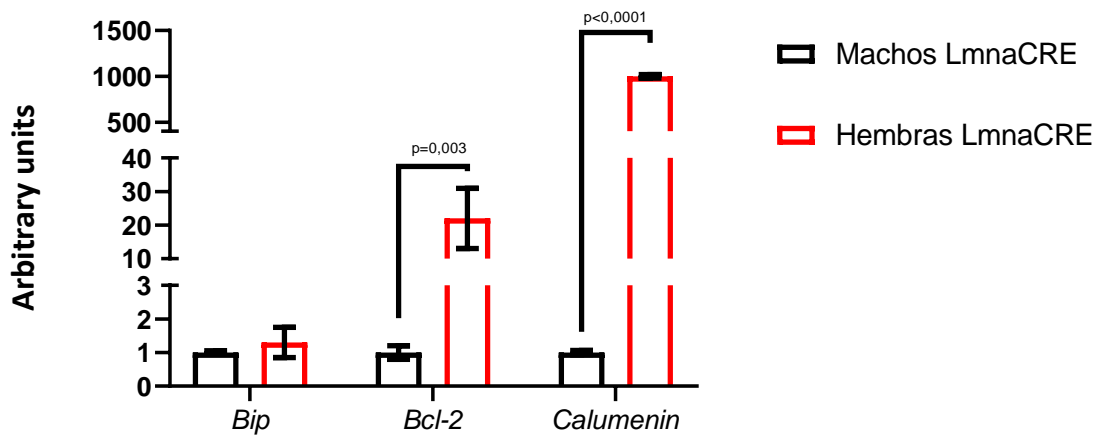


Figura 22. Análisis, mediante q-PCR, de la expresión de *Bip*, *Bcl2* y *Caluminina* en muestras de machos y hembras del modelo de ratón de cardiomiopatía dilatada LmnaCRE. Se observa una expresión superior de *Bcl2* (p=0,003) y *Caluminina* (p<0,0001) en el caso de las hembras.

Finalmente, se estudió la expresión de distintas moléculas de la vía UPR y relacionadas con esta vía en cardiomiocitos provenientes de cultivos primarios de neonato y de estadio embrionario E18,5 de ratón que sobre expresaban *Walras*, usando tres poblaciones de cardiomiocitos distintas para ambos estadios, siendo estas, cardiomiocitos control no infectados (NI), cardiomiocitos infectados con *Ad-Scrambled-GFP* (GFP) y cardiomiocitos infectados con *Ad-Walras-GFP* (*Walras-IRES-GFP*). Se observó un aumento en la expresión de las tres moléculas principales en la activación de la vía UPR - *Atf6*, *Ire1* y *Perk*-, de otros componentes de esta misma vía como son *Bip*, *Atf4*, y de *Caluminina* y *Bcl-2*, acompañado de una reducción en los niveles de *p53*, *Chop* y *Xbp1* en cardiomiocitos derivados de estadio embrionario E18,5. En el caso de los cardiomiocitos neonatales, al igual que en el caso anterior, se identificó un aumento en la expresión de *Atf6*, *Ire1*, *Perk*, además del resto de componentes de la vía UPR analizados como son *Chop*, *Bip*, *Atf4*, *Xbp1*, *p53*, *Caluminina* y *Bcl-2* (Figura 23).

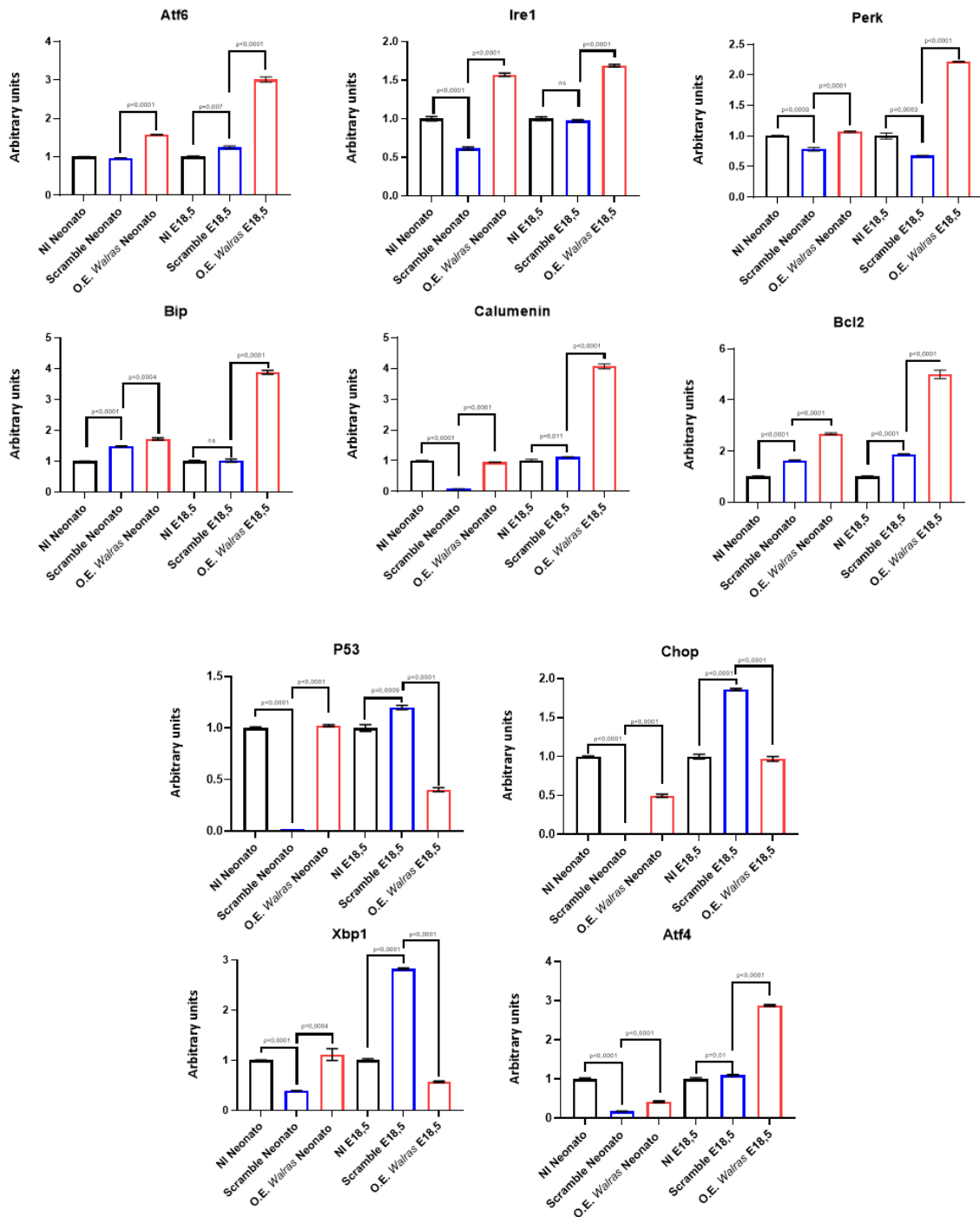


Figura 23. Análisis de la expresión de diversas moléculas de la vía UPR, en cardiomiocitos derivados de cultivos primarios de neonatos y ratones en estadio de desarrollo E18.5, que sobre expresaban *Walras*. Se observó una expresión aumentada de *Atf6* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), *Ire1* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), *Perk* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), *Bip* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), *Caluminina* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$), *Bcl-2* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) y *Atf4* ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) en ambas condiciones, *Xbp1* ($p = 0,0004$), *Chop* ($p < 0,0001$) y *P53* ($p < 0,0001$) se encontraban aumentados en cardiomiocitos de ratones E 18,5, y reducidos, *P53* ($p < 0,0001$), *Chop* ($p < 0,0001$) y *Xbp1* ($p < 0,0001$), en neonatos.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, se puede observar como la vía UPR se encuentra alterada en la cardiomiopatía dilatada. Además de ello, la expresión de *Walras* se incrementa durante ERS, jugando un papel fundamental en la viabilidad celular mediante la regulación de distintas moléculas involucradas en la vía UPR. Siendo necesario destacar el efecto negativo de *Walras* sobre los niveles de CALU, pudiendo ser inducida su degradación mediante la ubiquitinación. Finalmente, se ha podido observar la alteración en los niveles de las distintas moléculas de la vía UPR en provenientes de cultivos primarios de cardiomiocitos de neonatos y ratón en estadio de desarrollo E18,5.

5.10 Análisis mediante espectrofotometría de masas de *Walras*

Basándonos en datos previos de nuestro grupo, en los que se determinó que *Walras* podría tener la capacidad de interactuar con distintas proteínas mitocondriales. En dicho trabajo se usó una sonda biotinilada de *Walras* para estudiar las proteínas que se relacionan con este lncRNA mediante espectrofotometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que *Walras* interactuaba con 11 proteínas mitocondriales. Estas proteínas actuaban en procesos glucolíticos, metabolismo del ADP, gluconeogénesis y beta-oxidación de ácidos grasos. Además, se identificó mediante el análisis de las proteínas con las que reaccionaba *Walras*, que estas proteínas formaban parte del ciclo del ácido cítrico, la cadena de transporte de electrones y la activación transcripcional de la génesis de mitocondrias (García-Padilla et al., 2022) (Figura 24).

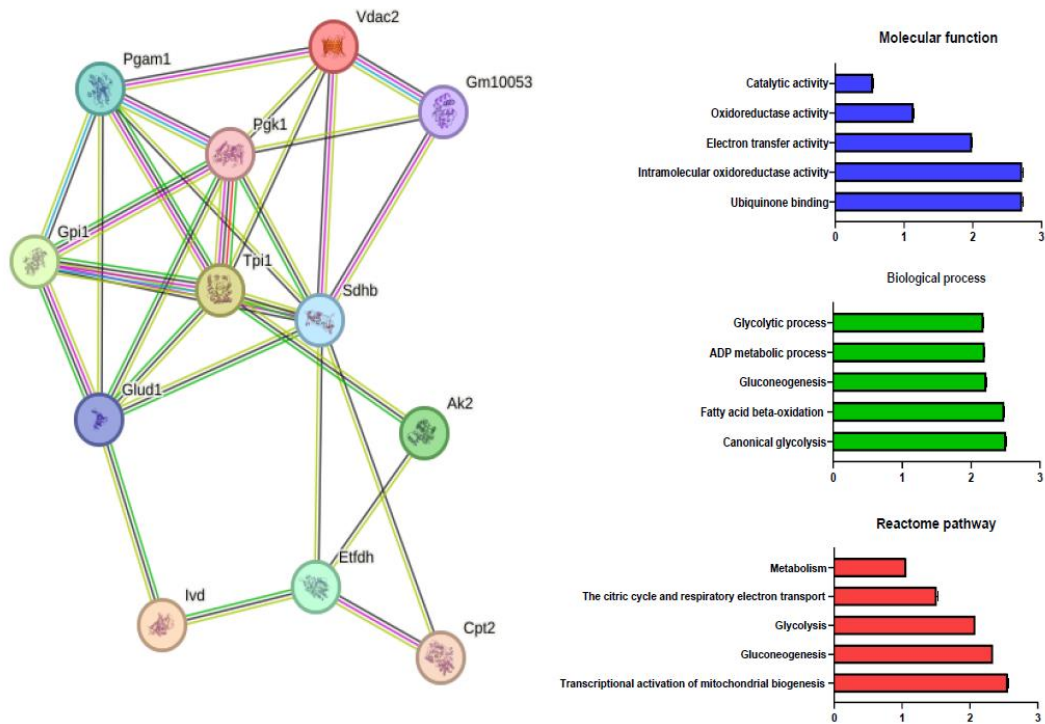


Figura 24. Estudio mediante espectrofotometría de masas de *Walras*.

Teniendo en cuenta los datos previos se pudo establecer una posible relación entre *Walras* y la función mitocondrial, por ello se procedió al estudio de diversos parámetros mitocondriales. Los análisis de Seahorse demostraron una reducción en la respiración máxima mitocondrial, cuando se inducía ERS y cuando *Walras* se encontraba sobre expresado, además de una reducción en la respiración asociada a ATP, no observándose diferencias en otros parámetros como la respiración no mitocondrial, la energía mitocondrial basal o la fuga de protones (Figura 25).

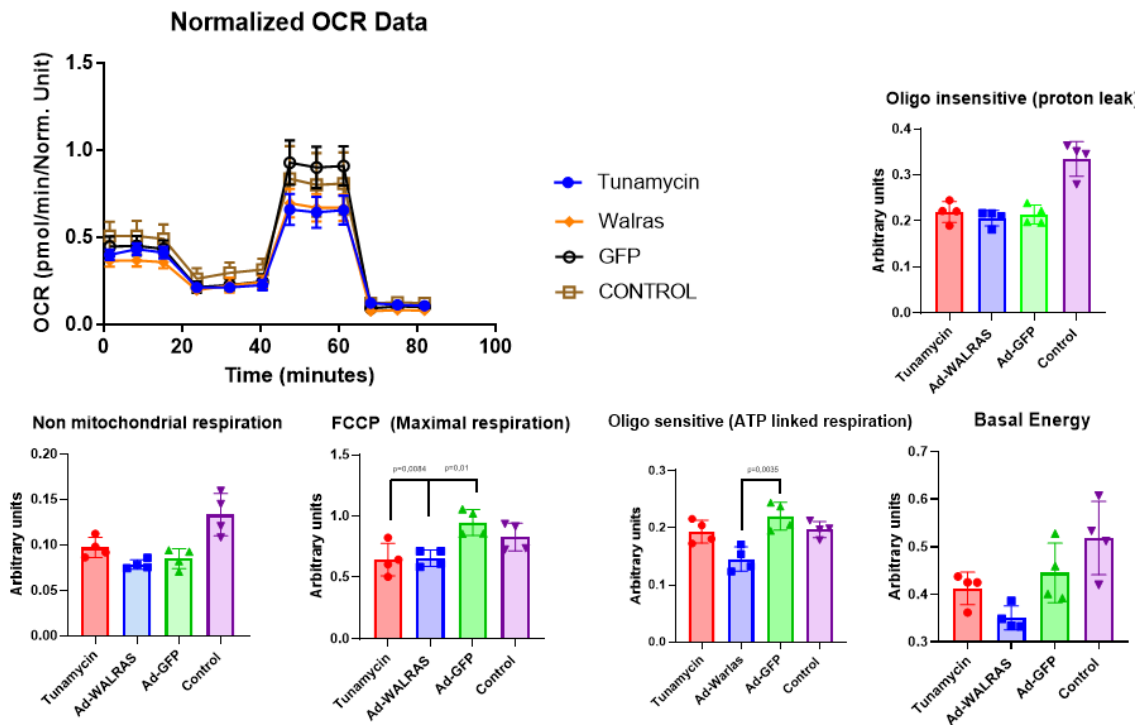


Figura 25. Análisis de distintos parámetros mitocondrial en HL1 sometidas a distintos tratamientos. Se identificó una reducción en la respiración máxima en el tratamiento con tunamicina ($p=0,0084$) y la sobreexpresión *Walras* (0,01), además de una reducción en la respiración asociada a ATP en la sobreexpresión de *Walras* (0,0035).

A su vez se analizó mediante inmunohistoquímica la abundancia de señal mitocondrial en células infectadas (Verde), con Ad-*Walras*-GFP o Ad-*Scrambled*-GFP, demostrando que había una reducción significativa en la presencia de esta señal en las mitocondrias de las células tras la sobre expresión de *Walras* (Figura 26).

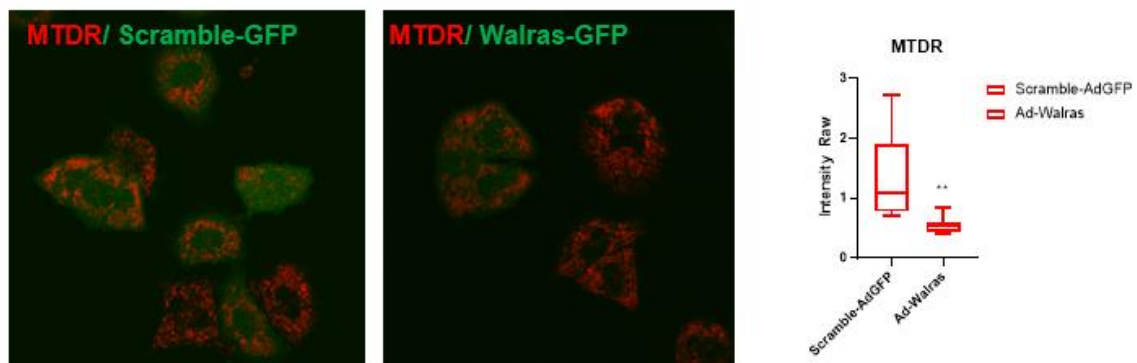


Figura 26. Análisis mediante inmunohistoquímica de la señal mitocondrial. Se determinó una reducción en la presencia de señal mitocondrial en aquellas células que sobre expresaban *Walras* ($p=0,002$).

Para finalizar, se analizó la expresión de *Pgc1*, una proteína relacionada con la biogénesis mitocondrial, *Drp1*, proteína asociada a la fisión de las mitocondrias, *Trap1*, chaperona mitocondrial sintetizada como respuesta al estrés, y el DNA mitocondrial, observándose una reducción en la expresión de *Trap1* y en los niveles de DNA mitocondrial, en las células que sobre expresaban *Walras* (Figura 27).

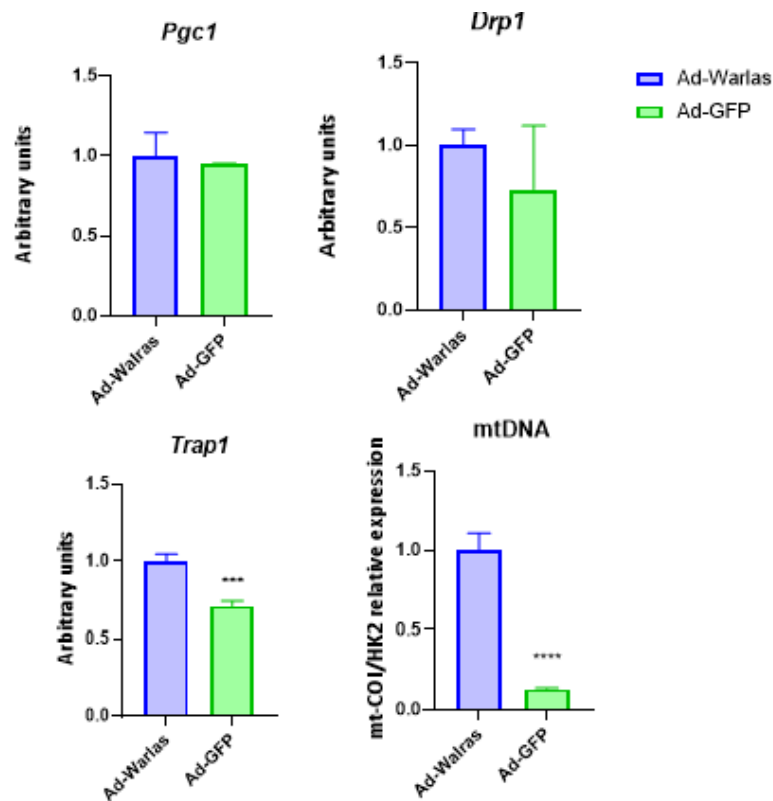


Figura 27. Análisis, mediante q-PCR, de los niveles de distintas proteínas mitocondriales y del DNA mitocondrial. Se identificó una reducción en la presencia de *Trap1* ($p=0,0008$) y del DNA mitocondrial ($p=0,0002$) en las células que sobre expresaban *Walras*.

En base a estos resultados se puede hipotetizar una posible relación entre los niveles de *Walras* y la homeostasis mitocondrial al observarse un efecto negativo de *Walras* sobre la cantidad de mitocondrias y su ADN, además de interactuar con proteínas implicadas en procesos biológicos llevados a cabo por ellas.

5.11 Análisis mediante espectrofotometría de masas de los homólogos humanos de *Walras* LINC02761 y APO02340.1

Previamente, nuestro grupo determinó la existencia de dos homólogos humanos de *Walras*, *LINC02761* y *APO02340.1*, en el contexto de AF. Estos homólogos presentaban

un porcentaje de homologías respecto a *Walras* de entre un 25% y un 43%, respetivamente (García-Padilla et al., 2022).

Con el fin de identificar posibles vías de señalización comunes entre *Walras*, *LINC02761* y *AP002340.1*, se usaron sondas biotiniladas para ambos lncRNAs para identificar posibles proteínas asociadas a estos lncRNAs mediante análisis de espectrofotometría de masas. Los resultados obtenidos indican que *LINC02761* interacciona con 143 proteínas (Tabla suplementaria 2). Las proteínas asociadas a *LINC02761* pertenecen a varios procesos biológicos como traducción mitocondrial, el *splicing* de RNAs mensajeros, traducción la replicación del ADN y la organización de subunidades del complejo de ribonucleoproteínas. Además de ello, el análisis de la red de proteínas con las que reacciona con *LINC02761* muestra que interacciona con distintas proteínas necesarias para el correcto inicio, alargamiento y terminación de la traducción mitocondrial en correlación con su expresión citoplasmática (Figura 28).

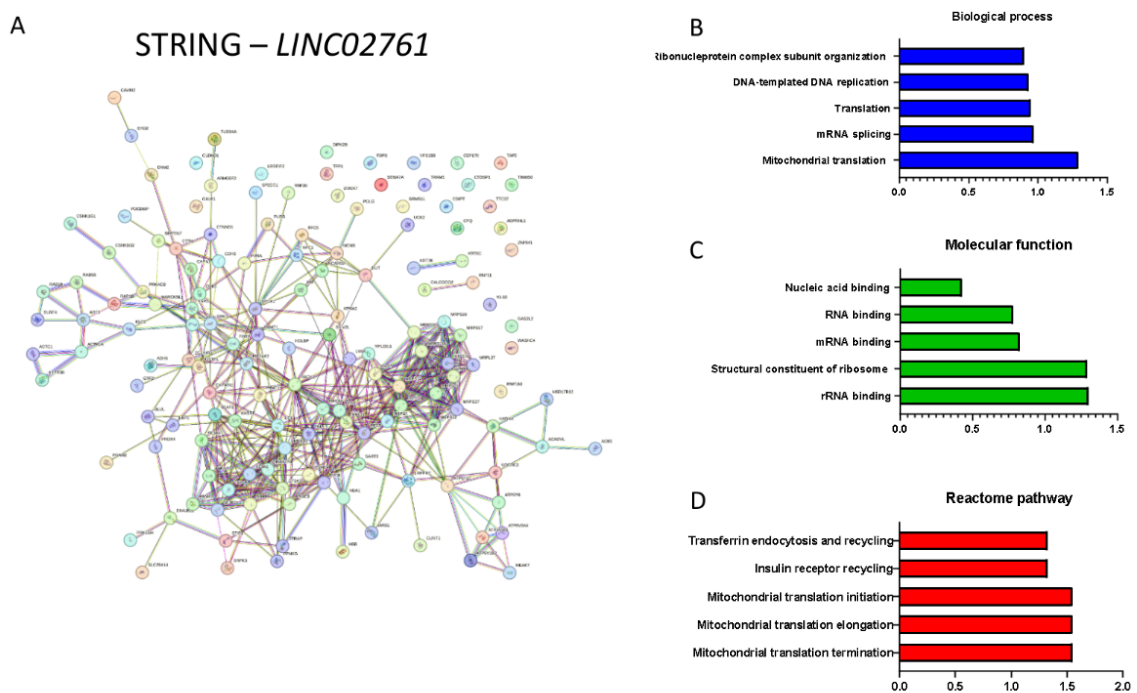
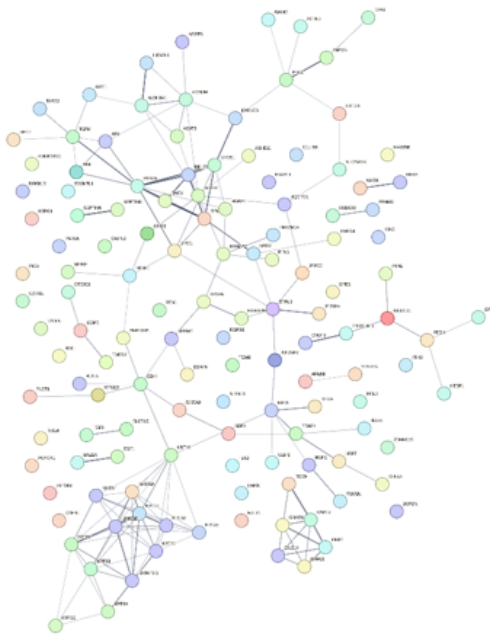


Figura 28. Estudio mediante espectrofotometría de masas de la interacción con proteínas de *LINC02741*.

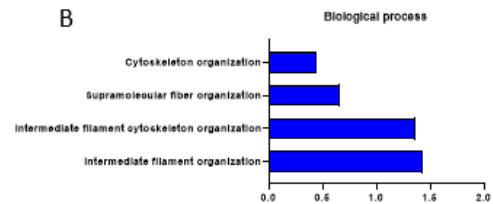
En el caso de *AP002340.1* se identificó que interacciona con 106 proteínas (Tabla suplementaria 3). Las proteínas que interaccionan con este lncRNA participan en procesos biológicos como la organización del citoesqueleto, la organización supramolecular de fibras, organización de los filamentos intermedios del citoesqueleto.

El análisis de la red de proteínas con las que reaccionaba *AP0002340.1* muestra que interactúa con distintas proteínas necesarias para la elongación de la cadena de péptidos, la respuesta del *EIF2AK4* frente a la deficiencia de aminoácidos, la queratinización y la formación del estrato corneo de la piel (Figura 29).

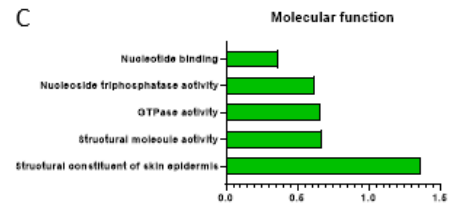
A STRING – *AP002340.1*



B



C



D

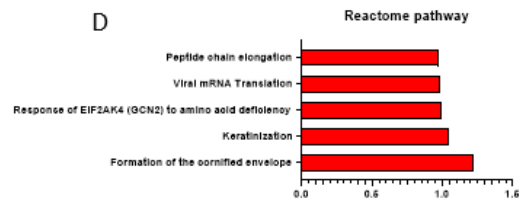


Figura 29. Estudio mediante espectrofotometría de masas de la interacción con proteínas de *AP002340.1*.

5.12 Estudio comparativo de las interacciones con proteínas de *Walras*, *LINC02761* y *APO02340.1*

A continuación, decidimos comprobar la posible existencia de alguna proteína que comparta interacción entre ambos homólogos y con *Walras*. La comparación con los dos homólogos humanos revela que no existe ninguna proteína común para ambos (Figura 30). Estos datos indican que estos homólogos no participan en los mismos procesos biológicos.

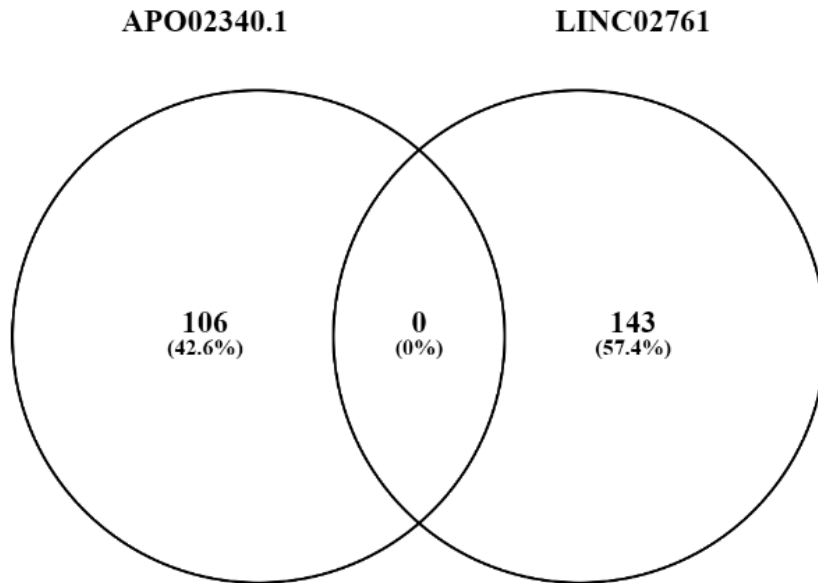


Figura 30. Comparativa de interacción de proteínas entre *APO02340.1* y *LINC02761*.

Posteriormente procedimos a comparar las proteínas que interactúan con *APO02340.1* y *Walras* (Figura 31), y *LINC02761* y *Walras* (Figura 32), no presentando ninguna proteína común. Estos resultados indican que *Walras*, *APO02340.1* y *LINC02761* no actúan en procesos biológicos comunes.

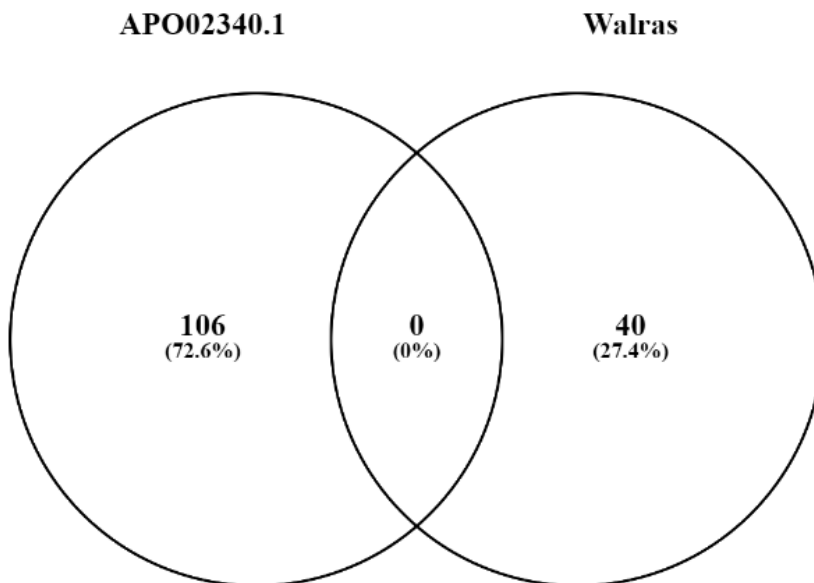


Figura 31. Comparativa de interacción de proteínas entre *APO02340.1* y *Walras*.

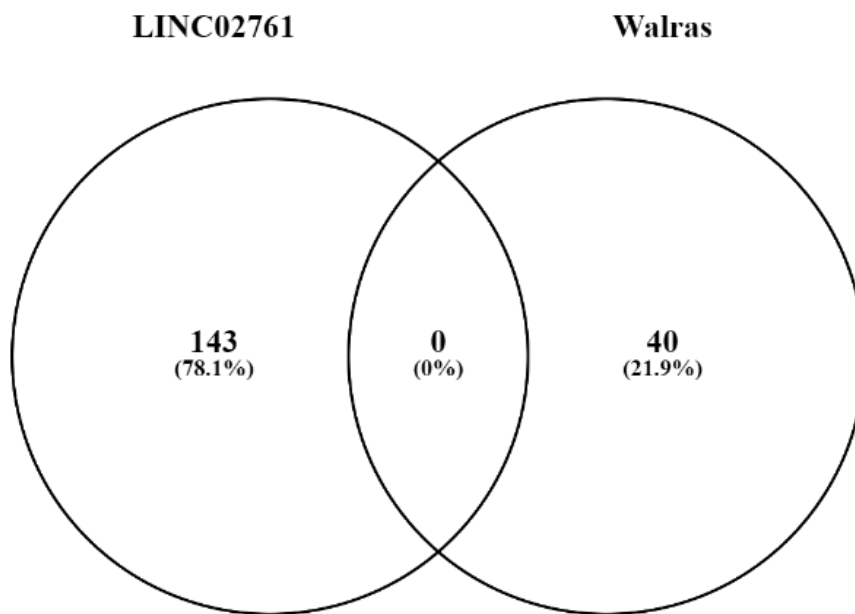


Figura 32. Comparativa de interacción de proteínas entre *LINC027611* y *Walras*.

Por último, decidimos comprobar si existía alguna proteína común a los tres LncRNAs, no identificándose ninguna (Figura 33).

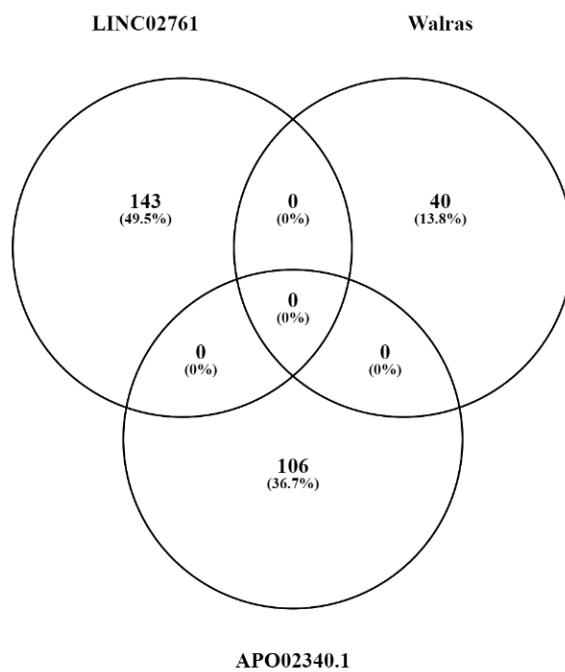


Figura 33. Comparativa de interacción de proteínas entre *LINC027611*, *APO02340.1* y *Walras*.

Estos resultados nos indicaron que la inexistencia de proteínas comunes entre estos tres lncRNAs, pese a su homología de secuencia respecto a *Walras*.

5.13 Papel funcional de los homólogos humanos de *Walras* *LINC02761* y *AP002340.1* en la señalización de la vía UPR

Dado que la cardiomiopatía dilatada tiene un papel deletéreo en humanos se procedió a analizar si los dos lncRNAs homólogos humanos de *Walras* descritos con anterioridad podrían participar en la señalización de la vía UPR al igual que lo observado con *Walras* en ratón. En trabajos previos de nuestro grupo, se estableció una presencia preferencial de *Walras* en el núcleo en HL1 (García-Padilla *et al*; 2022). Por ello, se decidió analizar la distribución subcelular de *LINC02761* y *AP002340.1* en AC16 (cardiomiocitos humanos), observándose una expresión enriquecida en el citoplasma en el caso de *LINC02761* y una localización nuclear de *AP002340* (Figura 34), siendo *AP002340.1* el que presentaba una distribución subcelular similar a la determinada para *Walras*.

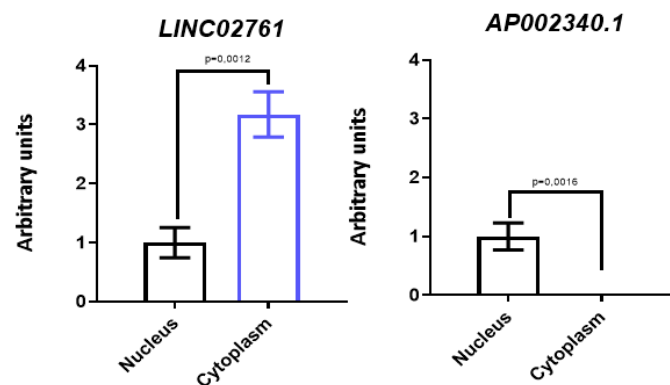


Figura 34. Distribución subcelular de *LINC02761* y *AP002340.1*. Se ha identificado una mayor presencia en citoplasma en el caso de *LINC02761* ($p=0,0012$) y nuclear en el caso de *AP002340.1* ($p=0,0016$).

Para establecer si la expresión de *LINC02761* y *AP002340.1* puede estar regulada por hormonas femeninas como el β -estradiol, se trataron células AC16 con esta hormona, observándose que la expresión de *AP002340.1*, pero no *LINC02761*, se ve reducida (Figura 35), de una manera similar a lo observado para *Walras*.

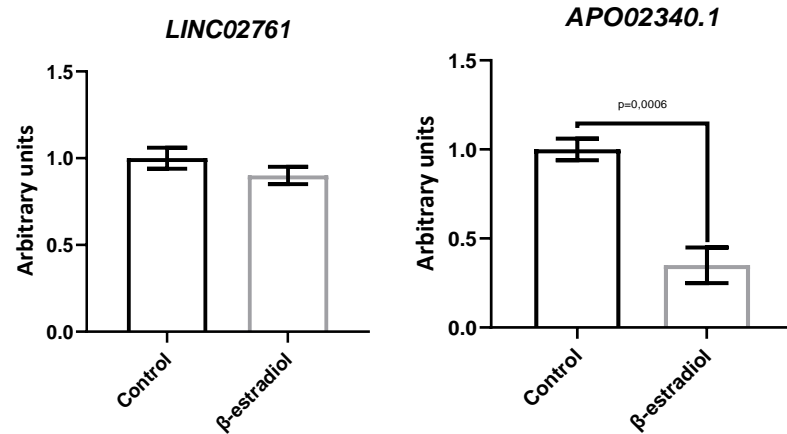


Figura 35. Modulación de la presencia de los LncRnas de interés en AC16 expuestas a β -estradiol. Se puede observar una reducción de los niveles de expresión de *APO02340.1* ($p=0,0006$).

A continuación, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función de *LINC02761* y de ganancia de función de *APO02340.1* en células AC16. Se determinó una regulación positiva de *ATF6*, *IRE1* y *PERK* en ambos ensayos de ganancia de función, observándose una regulación negativa de *ATF6* e *IRE1* en el caso de la pérdida de función de *LINC02761* (Figura 36)

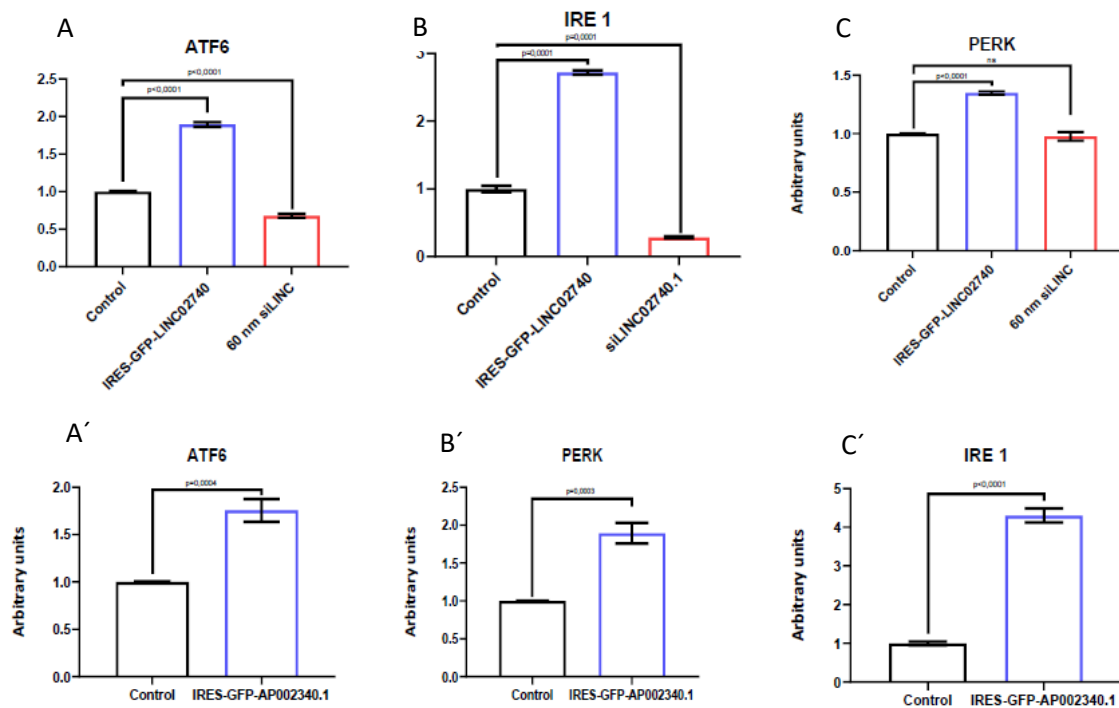
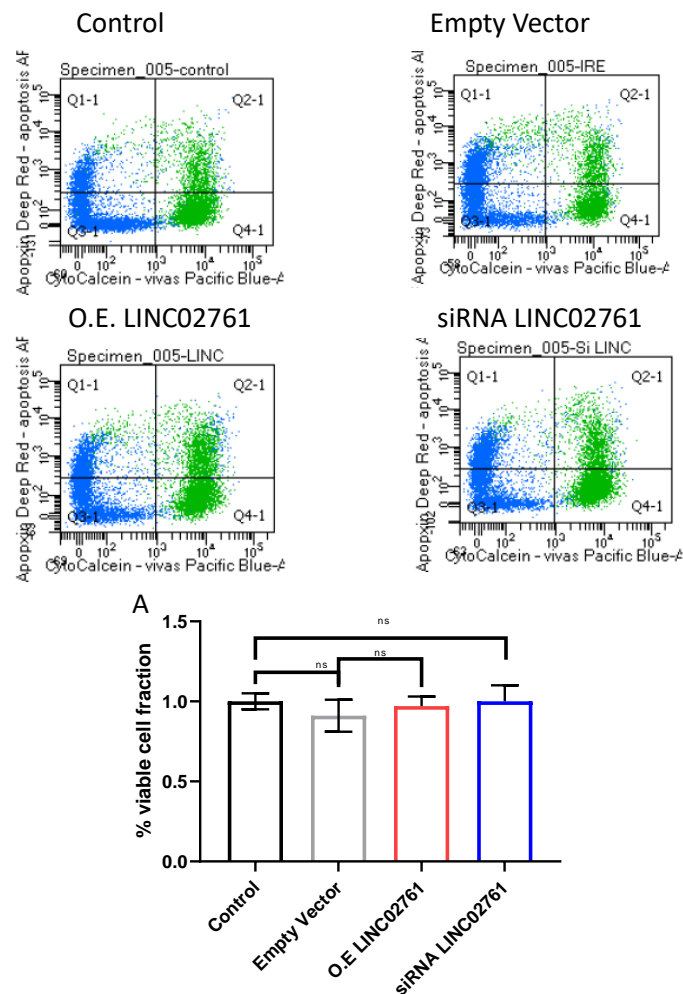


Figura 36. Ensayos de ganancia y pérdida de función de *LINC02761*(29 A-C) y de ganancia de función de *APO02340.1*(29 A'-C'). Se identificó una regulación positiva de *ATF6* ($p<0,0001$), *IRE1* ($P<0,0001$) y *PERK*

en la ganancia de función de *LINC02761* y una regulación negativa de ATF6 ($P < 0,0001$) y de IRE1 ($P < 0,0001$) en la pérdida de función. Por otro lado, se observó una regulación positiva de ATF6 ($p = 0,0004$), PERK ($p = 0,0003$) e IRE1 ($p < 0,0001$) en ensayo de ganancia de función de *AP002340.1*

Estos datos sugieren que ambos lncRNAs pueden modular la activación de la vía UPR en células AC16, dado que esta vía puede conducir a un aumento en la apoptosis y por ello una reducción en la viabilidad celular. Por ello, se analizó en ensayos de ganancia y pérdida de función de *LINC02761* y de ganancia de función de *AP002340.1* la viabilidad celular. Se observó que la viabilidad no se alteraba en el caso de la modulación de *LINC02761* (Figura 37 A), en cambio la viabilidad se veía reducida alrededor del 50 por ciento en aquellas células en las que la expresión de *AP002340.1* se encontraba aumentada. Además, se analizó si el tratamiento con UBA1 modificaba este efecto sobre la viabilidad celular, como se observaba en el caso de *Walras*, mostrándose una leve recuperación de la viabilidad en celular (Figura 37 B).



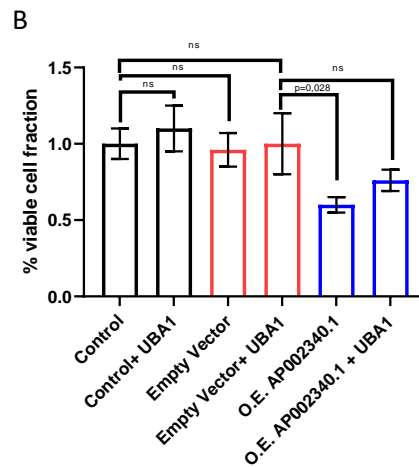
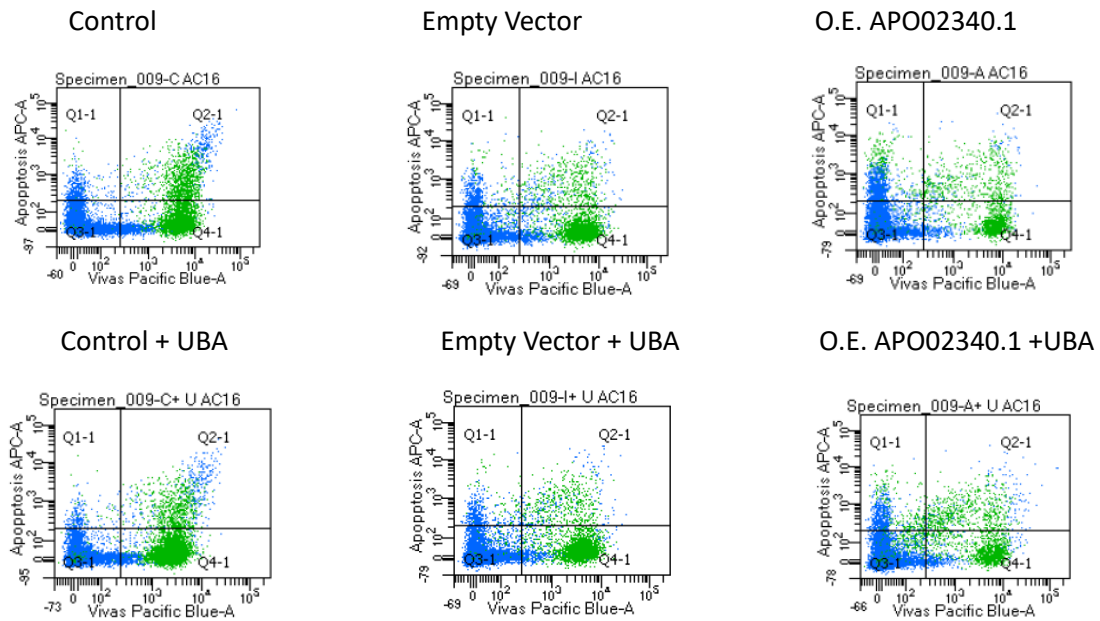


Figura 37. Estudio de la viabilidad de células AC16 que presentaban una expresión aumentada o disminuida de *LINC02741* (A), y que sobre expresaban *AP002340.1* y trataban con UBA1 (B).

Para determinar si *LINC02761* y *AP002340.1* podrían modular la vía UPR de una manera similar a como lo hace *Walras*, se procedió a analizar, mediante un análisis inmunohistoquímico, los niveles de CALU en estudios de ganancia y pérdida de función de *LINC02761* y la ganancia de función de *AP002340.1* en células AC16. Se identificó una reducción en la presencia de CALU en las células en las que se encontraban sobre expresados ambos lncRNAs, además de un aumento de esta en las células en la que la expresión de *LINC02761* se encontraba reducida (Figura 38)

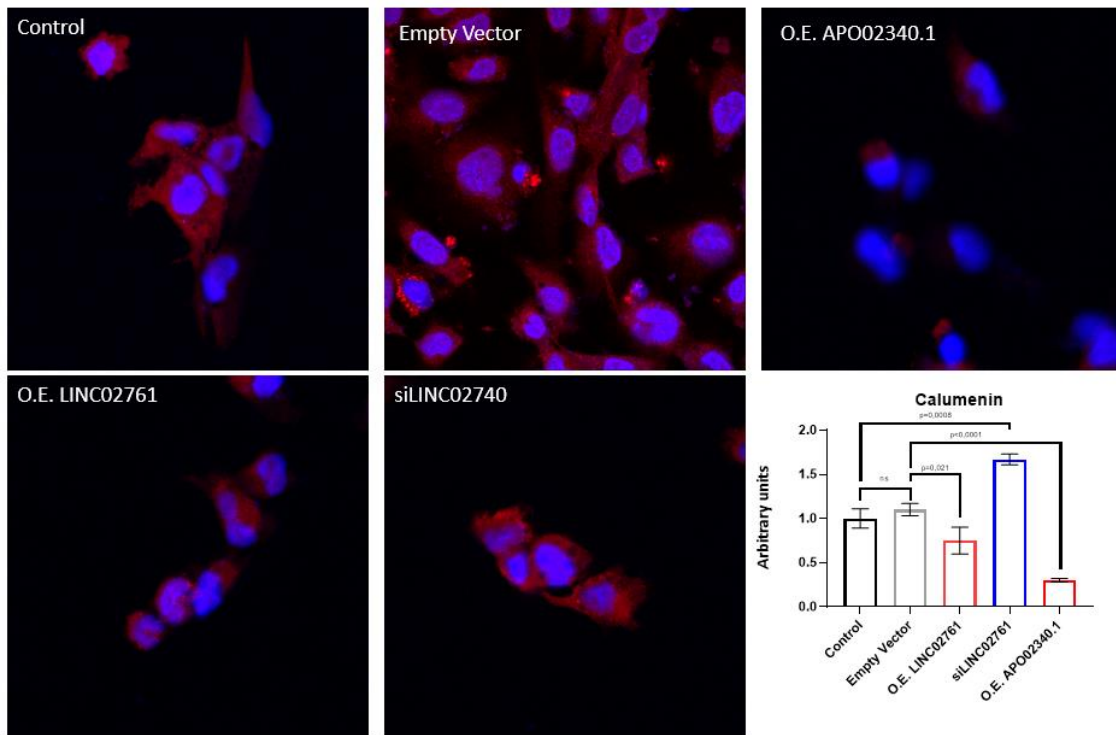


Figura 38. Estudio inmunohistoquímico de la presencia de *CALU* (Rojo) en AC16. Se determinó que los niveles de *CALU* se veían reducidos cuando se producía la sobre expresión de *LINC02761* ($p=0,021$) y *APO02340.1* ($p<0,0001$) y aumentados cuando la expresión de *LINC02741* se encontraba reducida ($p=0,0008$).

A continuación, decidimos estudiar si existía una interacción física directa entre *LINC02761* y *APO02340.1* con *CALU*. Los resultados obtenidos nos indicaron que no existía una interacción directa en este caso (Figura 39)

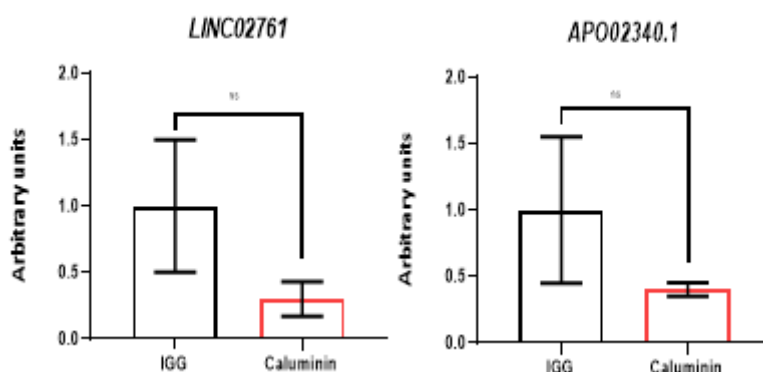
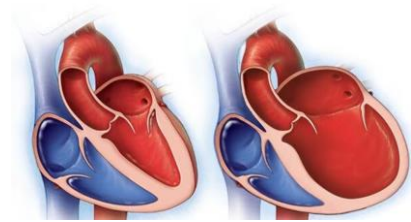


Figura 39. Ensayo de inmunoprecipitación de ARN para *Linc02761* y *APO02340.1*. No se observa un enriquecimiento de *Caluminina* frente al control, siendo las diferencias observadas no significativas.

Teniendo en cuenta los datos anteriores es posible afirmar que los dos homólogos de *Walras* estudiados- *LINC02761* y *AP002340.1*- desempeñan un papel regulador en la vía UPR, llevándose a cabo esta regulación a través de la modulación de los niveles de CALU, al igual que *Walras*, pero siendo en este caso mediante una interacción indirecta. Solo en el caso de células que sobre expresaban *AP002340.1* se ha podido observar una alteración en la viabilidad, siendo levemente revertida por el tratamiento con UBA1.

DISCUSIÓN



6.Discusión

En los últimos años, se ha incrementado el interés en el rol fundamental que desempeñan los lncRNA en el desarrollo cardíaco, así como en el establecimiento y progresión de distintas patologías cardíacas. Uno de los ejemplos de patologías cardíacas en los que se ha observado una modulación llevada a cabo por distintos lncRNAs es la cardiomiopatía dilatada. Esta enfermedad es una de las principales causas de fallo cardíaco, presentando una incidencia con proporción 3:1 entre hombres y mujeres. La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por un incremento del tamaño ventricular, acompañado de una disfunción de la capacidad contráctil y una reducción de la fracción de eyección ventricular, sin ser estas alteraciones a consecuencia de una enfermedad coronaria o cambios en la presión o volumen sanguíneo (Heymans *et al.*, 2023). En el contexto de la cardiomiopatía dilatada, se ha identificado que la fibrilación atrial (FA) puede influir en la progresión de esta patología hacia fenotipos más severos, y por ello incrementar la mortalidad (Nuzzi *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2022). En los últimos años se ha planteado la existencia de una posible relación entre la progresión de la cardiomiopatía dilatada y el estrés del retículo endoplasmático, a través de la modulación de la apoptosis de cardiomiocitos asociada a la vía UPR (Al-Yacoub *et al.*; 2021). En este contexto, es importante analizar el posible papel que pueden desempeñar los lncRNAs.

En nuestro estudio, hemos identificado la desregulación en modelos murinos de cardiomiopatía dilatada y cardiomiopatía hipertrófica de cinco lncRNAs- *Walar*, *Wala*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras*- previamente descritos en AF (García-Padilla *et al.*, 2022). Es importante resaltar que se ha observado una expresión diferencial entre machos y hembras en dichos modelos, mostrando un aumento en la expresión de estos lncRNAs en el caso de los machos y una disminución en las hembras. Esta desregulación sugiere una expresión dependiente o regulada por el sexo. Así, la expresión de estos lncRNAs se encuentra regulada a la baja por la hormona sexual β -estradiol, demostrando que dicha desregulación está modulada por hormonas sexuales. Estas observaciones se encuentran en línea a lo observado en el trabajo de Zhu *et al.*, 2020, en el cual compararon la expresión de distintos lncRNA entre ratones hembra, a las que se les realizó una ovariectomía para reducir los niveles en las hormonas sexuales femeninas, en comparación con sus controles. Identificaron una expresión al alza de 1109 lncRNAs

y a la baja de 390 lncRNAs en los ratones hembra sometido a ovariectomía (Zhu *et al.*, 2021). Estas observaciones, junto con las diferencias de expresión entre machos y hembras identificadas en los modelos de DCM y HCM, pueden relacionarse con diversos estudios en los que se ha estudiado la prevalencia de las enfermedades cardíacas, y su progresión comparando ambos sexos. En estos estudios se identificaron manifestaciones clínicas más graves en el caso del sexo masculino y una menor propensión de las enfermedades cardiovasculares en el caso del sexo femenino, acompañado de una menor gravedad y mejor pronóstico (Regitz-Zagrosek, y Kararigas, 2016). Curiosamente, se ha observado que estas diferencias entre sexos desaparecen y se igualan cuando las mujeres alcanzan la menopausia, y sus niveles hormonales se reducen, pudiendo indicar un papel protector de las hormonas sexuales femeninas frente a las enfermedades cardíacas (Kuznetsova *et al.*, 2018).

Por otro lado, la desregulación observada en estos modelos sugiere que estos lncRNAs pueden estar involucrados en el establecimiento y la progresión tanto de la cardiomiopatía dilatada como de la cardiomiopatía hipertrófica. Así, varios autores han descrito el papel de determinados lncRNAs en la patogénesis de estas enfermedades (Martens *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2024). Por ejemplo, Fan *et al.*, 2021 describió el papel beneficioso *ZNF935-AS* en la cardiomiopatía dilatada. *ZNF935-AS*, se encuentra reducido en muestras de pacientes con DCM y muestras de modelo experimental de esta patología en ratón. Estudios de ganancia de función de este lncRNA en ratón, mostraban una atenuación en las alteraciones de la función contráctil cardíaca, y del flujo y homeostasis de calcio de los cardiomiocitos durante la contracción, observándose el efecto contrario en la pérdida de función (Fan *et al.*, 2021). Otro ejemplo, es el lncRNA *CHKB-DT*, que se encuentra regulado a la baja en muestras de pacientes con cardiomiopatía dilatada y ratones modelo para esta patología mediante constricción aórtica transversal. Modelos de ratón heterocigotos para *CHKB-DT*, generados mediante CRISPR/Cas9, presentaban una dilatación y disfunción ventricular, similar a la identificada en la cardiomiopatía dilatada en humanos (Nie *et al.*, 2024). En la HCM, se ha descrito la presencia de distintos lncRNAs, siendo algunos ejemplos, los lncRNAs *LA16c-312E8.2*, *RP5-1160K1.3*, y *MIR22HG*. Estos lncRNAs se encuentran desregulados en muestras de pacientes que padecían esta patología, entre otros lncRNAs descritos en

este estudio, pudiendo actuar como biomarcadores de esta enfermedad y posibles dianas terapéuticas (Cao y Yuan, 2022).

Por último, no se identificó desregulación en machos de un modelo experimental de infarto agudo de miocardio, si bien se constató un incremento de los niveles de *Walar* y *Walrad* en la zona infartada de las hembras. Esta diferencia, respecto a los modelos anteriores, puede deberse a que en este caso se trata de una patología aguda, mientras que las patologías anteriores son procesos crónicos. Diferentes autores han demostrado que los mecanismos moleculares subyacentes entre ambos tipos de procesos- crónicos y agudos- son distintos, pudiendo afectar de forma variable a la homeostasis celular. Del mismo modo, varios estudios han señalado que un mismo proceso celular y/o molecular puede actuar de forma opuesta en determinadas patologías, como la cardiomiopatía dilatada -proceso crónico- o el infarto agudo de miocardio -proceso agudo-. Por ejemplo, la vía UPR actúa como un factor deletéreo en esta primera, mientras que en el infarto de miocardio juega un papel protector al inhibir los daños celulares asociados a la hipoxia (Minamino *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2024).

En los últimos años, se ha identificado al estrés del retículo endoplasmático como uno de los procesos relacionados con la aparición y progresión de DCM, junto con otros factores previamente estudiados como las mutaciones en genes sarcoméricos, del citoesqueleto o envoltura nuclear (Weintraub *et al.*, 2017). En este trabajo, identificamos en el modelo LmnaCRE, una mayor activación de la vía pro apoptótica de la vía UPR y una regulación a la baja de distintas proteínas anti apoptóticas en machos, observándose en las hembras una mayor activación de la vía anti apoptótica, además de la regulación al alza de varias proteínas anti apoptóticas. Estos datos sugieren que existe una mayor afectación patofisiológica en machos, mediada por la vía UPR. A partir de estos resultados, es posible plantear un nexo entre las diferencias en la activación de la vía UPR y la desregulación y expresión diferencial entre machos y hembras de los lncRNAs en estudio. No habiéndose realizado previamente la comparativa de la activación de la vía UPR entre machos y hembras en el contexto de las patologías cardíacas, si ha sido descrita en otros contextos patológicos como se detalla a continuación. Hundscheid *et al.*, 2018 identificó una mayor activación de la vía UPR en tejido de pacientes masculinos,

los cuales había sufrido isquemia y reperfusión intestinal, en comparación con mujeres en el mismo contexto. El tejido de los pacientes masculinos presentaba una mayor afectación y apoptosis del epitelio intestinal, y una mayor inflamación, identificándose una mayor resistencia a la apoptosis en el caso del tejido perteneciente a las mujeres (Hundscheid *et al.*, 2018).

En la cardiomiopatía dilatada, el principal tipo celular afectado son los cardiomiocitos, presentando una hipertrofia acompañada de alteraciones en el citoesqueleto (Reichart *et al.*, 2019). De los cinco lncRNAs estudiados, *Walras* muestran una expresión enriquecida en el miocardio, tanto en modelos *in vitro* como en secciones histológicas de corazones embrionarios de ratón. Esta expresión miocárdica, junto con una intensa desregulación tanto en los modelos de DCM como de HCM, señala a *Walras* como un posible agente modulador de los mecanismos moleculares subyacentes en estas patologías, concretamente en la DCM.

Estudios de ganancia y pérdida de función de *Walras* indicaron su capacidad para activar la vía pro apoptótica de UPR, de una manera similar a lo identificado en el modelo LmnaCRE. Además de ello, se identificó aumentos de la apoptosis celular y la viabilidad celular en estudios de ganancia y pérdida de función de *Walras*, respectivamente. De esta manera, se identificó la posible relación entre los niveles aumentados de *Walras* en machos, y la activación de la vía pro apoptótica de UPR tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados se pueden relacionar a su vez con la apoptosis relacionada con el estrés del retículo y la vía UPR, siendo este uno de los mecanismos relacionados con la DCM (Toro *et al.*, 2022). Por ejemplo, en el trabajo de Ortega *et al.*, 2014 se puede identificar una activación de la vía UPR, en muestras de ventrículo izquierdo de pacientes con DCM, a través de los niveles aumentados de moléculas claves en esta vía como *BIP*(*GRP78*), *ATF6*, *XBP1* e *IRE1-p*, afectando esta activación de forma negativa a diversas proteínas estructurales del retículo endoplasmático, y presentando una menor fracción de eyección (Ortega *et al.*, 2014). Castellero *et al.* (2015) estableció un aumento de distintas moléculas de la vía UPR, similar al estudio anterior, acompañado en este caso de un incremento en la apoptosis, en muestras de ventrículo izquierdo de pacientes que presentaban DCM (Castillero *et al.*, 2015). Del mismo modo, Qui *et al* (2020) observó un aumento de la apoptosis mediada por la vía UPR, y de moléculas relacionadas con este

tipo de apoptosis como Chop o Caspasa 3, en corazones pertenecientes a un modelo de rata de cardiomiopatía dilata (Qiu *et al.*, 2021). Nuestros resultados concuerdan con lo previamente descrito en la bibliografía, confirmando el potencial de *Walras* para inducir la apoptosis relacionada con la vía UPR, siendo este uno de los mecanismos relacionados con DCM.

Nuestro grupo, identificó previamente la capacidad de *Walras* para interactuar con distintas proteínas, encontrándose CALU entre ellas (García-Padilla *et al.*, 2022). CALU es una proteína que actúa como factor anti apoptótico y protector en la vía UPR. Su actividad fue descrita en cardiomiocitos ventriculares neonatales de rata, en los que se identificó un aumento en los niveles de CALU cuando se establecía el estado de estrés del retículo endoplasmático. En este estudio se identificó una reducción en la activación de la vía UPR y de la apoptosis relacionada con esta vía, cuando los niveles de CALU se encontraban aumentados (Lee y Kwon., 2013). En este trabajo demostramos que *Walras* establece una interacción física con CALU, identificándose una reducción de su presencia en aquellas células donde se había inducido la sobre expresión de *Walras*, e incrementándose en el caso de la pérdida de función de este. Esta modulación negativa, es realizada a través de la ubiquitinación y degradación proteosomal, al revertirse esta acción cuando la ubiquitinación se encuentra inhibida. Este mecanismo es una de las funciones conocidas de los lncRNAs (Ferre *et al.*, 2016), como se puede observar en el caso del lncRNA *HEPFAL*. En el contexto del hepatocarcinoma celular, este lncRNA presenta la capacidad de favorecer la ubiquitinación de *SCL7A11*, un componente fundamental del sistema antiporte cistina-glutamato que actúa un regulador fundamental de la ferroptosis, alterando su estabilidad e induciendo una reducción en sus niveles (Zhang *et al.*, 2022).

Por otro lado, es necesario tener en cuenta, la existencia de diferencias respecto a la sobre expresión de *Walras* en cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales y E18,5 de ratón, respecto a los resultados obtenidos previamente *in vitro*. En este caso, se observa una activación de la vía UPR, desarrollándose una respuesta anti apoptótica asociada a esta vía. Una posible explicación de estas diferencias puede ser el contexto del experimento. En el caso de los cardiomiocitos primarios, este cultivo no está compuesto exclusivamente por cardiomiocitos, sino también por fibroblastos, pudiendo

modular las interacciones celulares la progresión e inducción del estrés del retículo endoplasmático y la vía UPR. Esta modulación ya fue identificada en el trabajo de Zhang *et al.*, 2019, en el cual se estableció la reducción de la apoptosis de cardiomiocitos a través del efecto paracrino de los fibroblastos sobre ellos (Zhang *et al.*, 2019).

Distintos estudios han mostrado la asociación de DCM con diversas alteraciones de la homeostasis mitocondrial. Algunos ejemplos son alteraciones en los genes que regulan la fusión y fisión mitocondrial, produciendo una reducción en la biogénesis de este orgánulo y desregulaciones en la cadena respiratoria mitocondrial y la fosforilación oxidativa, teniendo como consecuencia una deficiencia en la síntesis de ATP (Ramaccini *et al.*, 2021). Así en el trabajo de Wu *et al.*, 2021 se identificaron defectos estructurales, como desaparición de las crestas mitocondriales o membranas mitocondriales externas incompletas, reducción de tamaño de las mitocondrias, agregación mitocondrial, reducción en genes codificantes de proteínas encargadas del recambio y metabolismo mitocondrial, además de reducción en los niveles de proteínas que actúan como marcadores mitocondriales, en corazones de ratones de un modelo experimental de DCM (Wu *et al.*, 2021). De manera similar, Zhang *et al.* (2014) identificó en un modelo experimental de DCM en rata un incremento de la apoptosis del miocardio, incremento de caspasa 12 y caspasa 3, alteraciones estructurales en la mitocondria con crestas mitocondriales degradadas o desaparecidas, reducción en el potencial de membrana y actividad enzimática mitocondrial (Zhang *et al.*, 2014). En muestras de pacientes humanos de DCM, se han identificado distintas mutaciones en el ADN mitocondrial en regiones que codifican ARN transferente mitocondrial, ARN ribosómico y distintas mutaciones de pérdida de sentido, además de mitocondrias gigantes, inclusiones dentro del orgánulo y alteraciones en la forma y distribución de las crestas mitocondriales (Arbustini *et al.*, 1998; Govindaraj *et al.*, 2019).

Estudios previos de nuestro grupo permitieron identificar la interacción *Walras* con 11 proteínas mitocondriales (*VDAC2*, *PGAM1*, *PGK1*, *GPI1*, *TPI1*, *SDHB*, *GLUD1*, *AK2*, *CPT2*, *ETFDH*, *IVD*) que están involucradas en distintos procesos mitocondriales (García-Padilla *et al.*, 2022). En este trabajo hemos demostrado una reducción en la respiración máxima y la respiración unida a la síntesis de ATP, en células en las que se había inducido la sobre expresión de *Walras*, indicando un efecto negativo sobre la respiración llevada

a cabo por la mitocondria. Además de ello, se observó una reducción de la respiración mitocondrial cuando se trataban las células con tunamicina, induciendo de esta manera el estrés del retículo endoplasmático, presentando un efecto similar en ambos tratamientos. De forma complementaria, se producía una reducción en la masa mitocondrial total, en las células en las que se encontraba sobre expresado *Walras*, pudiendo explicar que la alteración de la función mitocondrial observada pueda ser debida a alteraciones en el número de mitocondrias. Es necesario destacar los posibles efectos sobre la homeostasis celular de la alteración inducida por *Walras*, debido a que el retículo endoplasmático y la mitocondria se encuentra en constante interconexión mediante las membranas asociadas a mitocondrias. A través de estas membranas, se produce un flujo de calcio y moléculas que pueden interaccionar con Bip. Durante el estrés del retículo endoplasmático, esta interconexión se ve alterada, afectando de esta manera a la actividad energética de este orgánulo. La incorporación de calcio proveniente del retículo endoplasmático por parte de la mitocondria estimula la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP (Bravo *et al*; 2012), siendo esto una explicación a las alteraciones en la homeostasis de las mitocondrias y su respiración debidas a *Walras*, a través de su capacidad de activar la vía UPR y su relación con el estrés del retículo endoplasmático. Los resultados obtenidos, en los que se identifica una alteración en la homeostasis mitocondrial por parte de *Walras*, relacionándose con su capacidad de modular la vía UPR y el estrés del retículo endoplasmático, concuerdan con lo previamente identificado en bibliografía.

En el mismo estudio previo de nuestro grupo, García-Padilla *et al.* (2022) indicó la existencia de dos homólogos humanos de *Walras*, llamados *LINC02761* y *APO02340.1*. *LINC02761* presenta una distribución preferentemente citoplasmática mientras que *APO02340.1* presenta una distribución nuclear y se encuentra sometido a una regulación negativa por β -estradiol, al igual que *Walras*. Análisis de pulldown lncRNA-proteína, para identificar las proteínas asociadas a cada uno de estos lncRNAs han puesto de manifiesto que no se identifican proteínas ni procesos celulares comunes entre *Walras* y sus homólogos. Estos datos permiten por tanto concluir que, pese a la homología a nivel de su secuencia nucleotídica, estos lncRNA no se asocian con las mismas proteínas y por tanto es posible que realicen distintas funciones. No obstante, es curioso que *LINC02761*

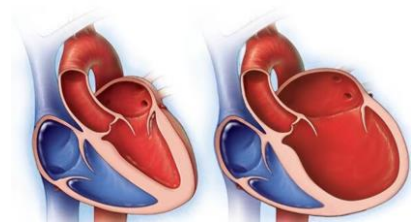
interacciona con distintas proteínas involucradas en la expresión del genoma mitocondrial, siendo la alteración de la homeostasis mitocondrial una causa establecida de la aparición del estrés del retículo endoplasmático (Xiao *et al.*, 2020). De modo similar, *APO02340.1* interacciona con proteínas implicada en la organización del citoesqueleto, identificándose las alteraciones del citoesqueleto y la subsiguiente pérdida de la homeostasis en los cardiomiocitos, como una de las causas de la aparición de estrés del retículo endoplasmático (Reichart *et al.*; 2019), y de DCM (Giri *et al.*, 2022). Estos datos sugieren que si bien estos tres lncRNAs no se asocian con las mismas proteínas, es posible que si ejerzan funciones similares, mediadas por distintos mecanismos.

En este contexto, nuestros estudios funcionales han revelado la capacidad de ambos homólogos de activar la vía UPR, de una manera similar a *Walras*, identificándose un efecto negativo de ambos lncRNAs sobre la presencia de CALU, sin bien es cierto que sin establecerse una interacción física directa. Además, la sobre expresión de *APO02340.1* produce un incremento en la apoptosis celular, levemente revertido por la inhibición de la ubiquitinación, al igual que se observa en el caso de *Walras*. Estos resultados nos muestran una homología de función, parcialmente conservada, entre *Walras* y sus homólogos humanos, al activar la vía UPR, a través de mecanismos y procesos celulares distintos, mostrando *APO02340.1* una mayor similitud tanto en secuencia como en función respecto a *Walras*.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos en este trabajo, es posible afirmar la existencia de una desregulación, y expresión diferencial entre machos y hembras, de un subconjunto de lncRNAs en modelos de DCM y HMC, pero no en infarto de miocardio. Siendo estos lncRNAs regulados de manera negativa por β -estradiol, presentando uno de estos lncRNAs, *Walras*, una expresión principalmente miocárdica. *Walras* posee la capacidad de activar la vía UPR y de modular negativamente los niveles de CALU, a través de la ubiquitinación y degradación proteosomal. Dado que CALU es una proteína anti apoptótica en el contexto de la vía UPR, dicha modulación favorece la apoptosis asociada a esta vía y como consecuencia, dichas alteraciones se ven incrementadas en ratones macho, en comparación con las hembras. De forma complementaria, *Walras* altera la respiración mitocondrial y reduce la cantidad de mitocondrias, produciendo una alteración de la homeostasis en cardiomiocitos, relacionándose con la activación de la

vía UPR. En último lugar, se ha establecido la existencia de una homología funcional parcial entre *Walras* y sus homólogos humanos, especialmente de *APO02340.1*, mediante la activación de la vía UPR, la modulación de CALU y la apoptosis asociada a esta vía, contribuyendo por tanto del mismo modo a las diferencias patofisiológicas entre machos y hembras.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



7.Conclusiones

Primera conclusión

Los lncRNAs *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* y *Walras* se encuentran desregulados diferencialmente en machos y hembras en modelos experimentales de DCM e HCM, pero no en procesos agudos como el infarto de miocardio, diferencias que están reguladas por la hormona β -estradiol.

Segunda conclusión

La vía UPR muestra una expresión diferencial en el modelo *Lmna*CRE de ratón de cardiomiopatía dilatada y *Walras* desempeña un papel esencial en la regulación de dicha vía mediante la modulación de los niveles de expresión de proteínas clave en esta vía tales como *Atf6*, *Ire1*, *Atf4*, *Bcl-2* y *Bip*, entre otras.

Tercera conclusión

Walras modula la vía UPR, en parte, por su interacción física con CALU, favoreciendo su degradación mediante la ubiquitinación, afectando de esta manera a la viabilidad celular.

Cuarta conclusión

Walras afecta a la homeostasis mitocondrial al alterar a la respiración máxima mitocondrial, la respiración asociada a síntesis de ATP y a la masa mitocondrial.

Quinta conclusión

LINC02761 interacciona con proteínas relacionadas con la homeostasis mitocondrial, el splicing de ARNs mensajeros y la organización de subunidades del complejo de ribonucleoproteínas, mientras que *APO02340.1* interacciona con diversas proteínas del citoesqueleto celular y su organización, no compartiendo proteínas comunes entre ellos y ni respecto a *Walras*.

Sexta conclusión

Los homólogos humanos de *Walras*, *LINC02761* y *APO02340.1*, regulan la expresión de distintas moléculas de la vía UPR, además de regular de forma negativa los niveles de

CALU, induciendo una reducción en la viabilidad de las células en el caso de *APO02340.1*, siendo esta alteración parcialmente revertida cuando se inhibe la ubiquitinación.

Conclusions

First conclusion

The *Walar*, *Walaa*, *Walrad*, *Wallrd* and *Walras* lncRNAs are differentially deregulated in males and females of DCM and HCM mouse experimental models, but not in a mouse model of acute processes such as myocardial infarction, differences that are regulated by the sexual hormone β -estradiol.

Second conclusion

The UPR pathway shows differential expression in the LmnaCRE dilated cardiomyopathy mouse model, and *Walras* plays an essential role in the regulation of this pathway by modulating the expression levels of key proteins in this pathway such as *Atf6*, *Ire1*, *Atf4*, *Bcl-2* and *Bip*, among others.

Third conclusion

Walras modulates the UPR pathway, in part, through its physical interaction with CALU, favouring its degradation through ubiquitination and thus affecting cell viability.

Fourth conclusion

Walras affects mitochondrial homeostasis by altering maximal mitochondrial respiration, ATP synthesis associated respiration and mitochondrial mass.

Fifth conclusion

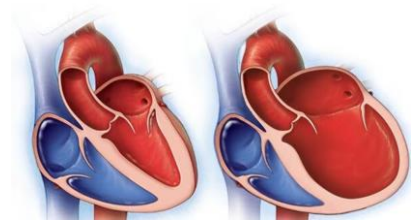
LINC02761 interacts with proteins related to mitochondrial homeostasis, mRNA splicing and ribonucleoprotein complex subunits, while *APO02340.1* interacts with various cellular cytoskeleton proteins, not sharing any common proteins between them or with *Walras*, respectively.

Sixth conclusion

The *Walras* human homologs, *LINC02761* and *APO02340.1*, regulate the expression of different molecules of the UPR pathway, as well as negatively regulating CALU levels,

inducing thus a reduction in cell viability for *APO02340.1*, being such alteration partially reversed when ubiquitination is inhibited.

BIBLIOGRAFÍA



8. Bibliografía

- Abhari, B. A., McCarthy, N., Le Berre, M., Kilcoyne, M., Joshi, L., Agostinis, P., & Fulda, S. (2019). Smac mimetic suppresses tunicamycin-induced apoptosis via resolution of ER stress. *Cell death & disease*, *10*(3), 155.
- Abu-Issa, R. (2014). Heart fields: spatial polarity and temporal dynamics. *The Anatomical Record*, *297*(2), 175-182.
- Abu-Issa, R., & Kirby, M. L. (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *23*, 45-68.
- Abu-Issa, R., Smyth, G., Smoak, I., Yamamura, K. I., & Meyers, E. N. (2002). Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular development in the mouse. Hubert, F., Payan, S. M., & Rochais, F. (2018). FGF10 signaling in heart development, homeostasis, disease and repair. *Frontiers in genetics*, *9*, 427417.
- Aguirre, L. A., Alonso, M. E., Badía-Careaga, C., Rollán, I., Arias, C., Fernández-Miñán, A., ... & Manzanares, M. (2015). Long-range regulatory interactions at the 4q25 atrial fibrillation risk locus involve PITX2c and ENPEP. *BMC biology*, *13*, 1-13.
- Almeida, L. M., Pinho, B. R., Duchon, M. R., & Oliveira, J. M. (2022). The PERKs of mitochondria protection during stress: insights for PERK modulation in neurodegenerative and metabolic diseases. *Biological Reviews*, *97*(5), 1737-1748.
- Al-Yacoub, N., Colak, D., Mahmoud, S. A., Hammonds, M., Muhammed, K., Al-Harazi, O., ... & Poizat, C. (2021). Mutation in FBXO32 causes dilated cardiomyopathy through up-regulation of ER-stress mediated apoptosis. *Communications Biology*, *4*(1), 884.
- András, V., Tomek, J., Nagy, N., Virág, L., Passini, E., Rodriguez, B., & Baczkó, I. (2021). Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmic behavior. *Physiological reviews*.
- Andrés-Delgado, L., & Mercader, N. (2016). Interplay between cardiac function and heart development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1863*(7), 1707-1716.
- Arbustini, E., Diegoli, M., Fasani, R., Grasso, M., Morbini, P., Banchieri, N., ... & Vigano, M. (1998). Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *The American journal of pathology*, *153*(5), 1501-1510.
- Arsenian, S., Weinhold, B., Oelgeschläger, M., Rütter, U., & Nordheim, A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *The EMBO journal*, *17*(21), 6289-6299.
- Benzoni, P., Nava, L., Giannetti, F., Guerini, G., Gualdoni, A., Bazzini, C., ... & Barbuti, A. (2021). Dual role of miR-1 in the development and function of sinoatrial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *157*, 104-112.
- Bhatt, H. V., & Fischer, G. W. (2015). Atrial fibrillation: pathophysiology and therapeutic options. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, *29*(5), 1333-1340.

- Biben, C., & Harvey, R. P. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene *eHand* during murine heart development. *Genes & development*, *11*(11), 1357-1369.
- Bischoff, F. C., Werner, A., John, D., Boeckel, J. N., Melissari, M. T., Grote, P., ... & Zehendner, C. M. (2017). Identification and functional characterization of hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress regulating lncRNA (HypERlnc) in pericytes. *Circulation Research*, *121*(4), 368-375.
- Blackwood, E. A., Bilal, A. S., Stauffer, W. T., Arrieta, A., & Glembotski, C. C. (2020). Designing novel therapies to mend broken hearts: ATF6 and cardiac proteostasis. *Cells*, *9*(3), 602.
- Boateng, S., & Sanborn, T. (2013). Acute myocardial infarction. *Disease-a-month: DM*, *59*(3), 83-96.
- Bondue, A., & Blanpain, C. (2010). *Mesp1*: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation research*, *107*(12), 1414-1427.
- Chiapparo, G., Lin, X., Lescroart, F., Chabab, S., Paulissen, C., Pitisci, L., ... & Blanpain, C. (2016). *Mesp1* controls the speed, polarity, and directionality of cardiovascular progenitor migration. *Journal of Cell Biology*, *213*(4), 463-477.
- Bonet, F., Dueñas, Á., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Aránega, A. E., & Franco, D. (2015). miR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation. *Developmental Dynamics*, *244*(10), 1259-1275.
- Bravo, R., Gutierrez, T., Paredes, F., Gatica, D., Rodriguez, A. E., Pedrozo, Z., ... & Lavandero, S. (2012). Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *44*(1), 16-20.
- Brewer, A., & Pizze, J. (2006). GATA factors in vertebrate heart development and disease. *Expert reviews in molecular medicine*, *8*(22), 1-20.
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, *220*(2), e202009045.
- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., ... & Seidman, J. G. (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell*, *106*(6), 709-721.
- Buijendijk, M. F., BRNAett, P., & van den Hoff, M. J. (2020, March). Development of the human heart. In *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* (Vol. 184, No. 1, pp. 7-22). Hoboken, USA: John Wiley & Sons, Inc..
- Cao, J., & Yuan, L. (2022). Identification of key genes for hypertrophic cardiomyopathy using integrated network analysis of differential lncRNA and gene expression. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *9*, 946229.
- Carlisle, M. A., Fudim, M., DeVore, A. D., & Piccini, J. P. (2019). Heart failure and atrial fibrillation, like fire and fury. *JACC: Heart Failure*, *7*(6), 447-456.

- Castillero, E., Akashi, H., Pendrak, K., Yerebakan, H., Najjar, M., Wang, C., ... & George, I. (2015). Attenuation of the unfolded protein response and endoplasmic reticulum stress after mechanical unloading in dilated cardiomyopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(3), H459-H470.
- Chen, J., Hu, Q., Zhang, B. F., Liu, X. P., Yang, S., & Jiang, H. (2019). Long noncoding RNA UCA1 inhibits ischaemia/reperfusion injury induced cardiomyocytes apoptosis via suppression of endoplasmic reticulum stress. *Genes & genomics*, 41, 803-810.
- Chen, L. L., & Yang, L. (2015). Regulation of circRNA biogenesis. *RNA biology*, 12(4), 381-388.
- Choi, H. J., & Yu, X. Z. (2023). ER stress: an emerging regulator in GVHD development. *Frontiers in Immunology*, 14, 1212215.
- Choy, K. W., Murugan, D., & Mustafa, M. R. (2018). Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacological research*, 132, 119-129.
- Crispino, J. D., Lodish, M. B., Thurberg, B. L., Litovsky, S. H., Collins, T., Molkenin, J. D., & Orkin, S. H. (2001). Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes & development*, 15(7), 839-844.
- D'Amato, G., Luxán, G., del Monte-Nieto, G., Martínez-Poveda, B., Torroja, C., Walter, W., ... & De La Pompa, J. L. (2016). Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nature cell biology*, 18(1), 7-20.
- Dahhan, A. (2019). Type 2 myocardial infarction: a grim diagnosis with different shades of gray. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 20(8), 510-517.
- Das, S., Mondal, A., Dey, C., Chakraborty, S., Bhowmik, R., Karmakar, S., & Sengupta, A. (2023). ER stress induces upregulation of transcription factor Tbx20 and downstream Bmp2 signaling to promote cardiomyocyte survival. *Journal of Biological Chemistry*, 299(4).
- Deshpande, A., Shetty, P. M. V., Frey, N., & Rangrez, A. Y. (2022). SRF: a seriously responsible factor in cardiac development and disease. *Journal of Biomedical Science*, 29(1), 38.
- Di Conza, G., & Ho, P. C. (2020). ER stress responses: an emerging modulator for innate immunity. *Cells*, 9(3), 695.
- Di Mauro, V., Crasto, S., Colombo, F. S., Di Pasquale, E., & Catalucci, D. (2019). Wnt signalling mediates miR-133a nuclear re-localization for the transcriptional control of Dnmt3b in cardiac cells. *Scientific Reports*, 9(1), 9320.
- Ding, L., Li, M., Yang, F., & Wang, J. (2022). CircNCX1: the "lord of the ring" in the heart—insight into its sequence characteristic, expression, molecular mechanisms, and clinical application. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 1-16.

- Du, H., Zhao, Y., Wen, J., Dai, B., Hu, G., Zhou, Y., ... & Chen, C. (2024). LncRNA DCRT Protects Against Dilated Cardiomyopathy by Preventing NDUFS2 Alternative Splicing by Binding to PTBP1. *Circulation*.
- Dueñas, A., Expósito, A., Muñoz, M. D. M., de Manuel, M. J., Cámara-Morales, A., Serrano-Osorio, F., ... & Franco, D. (2020). MiR-195 enhances cardiomyogenic differentiation of the proepicardium/septum transversum by Smurf1 and Foxp1 modulation. *Scientific reports*, *10*(1), 9334.
- Evans, S. M., Yelon, D., Conlon, F. L., & Kirby, M. L. (2010). Myocardial lineage development. *Circulation research*, *107*(12), 1428-1444.
- Fan, J., Li, H., Xie, R., Zhang, X., Nie, X., Shi, X., ... & Wang, D. W. (2021). LncRNA ZNF593-AS alleviates contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy. *Circulation Research*, *128*(11), 1708-1723.
- Ferre, F., Colantoni, A., & Helmer-Citterich, M. (2016). Revealing protein–lncRNA interaction. *Briefings in bioinformatics*, *17*(1), 106-116.
- Franco, D., & Campione, M. (2003). The role of pitx2 during cardiac development: Linking left–right signaling and congenital heart diseases. *Trends in cardiovascular medicine*, *13*(4), 157-163.
- Franco, D., Christoffels, V. M., & Campione, M. (2014). Homeobox transcription factor Pitx2: The rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*, *24*(1), 23-31.
- Franco, D., Markman, M. M., Wagenaar, G. T., Ya, J., Lamers, W. H., & Moorman, A. F. (1999). Myosin light chain 2a and 2v identifies the embryonic outflow tract myocardium in the developing rodent heart. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *254*(1), 135-146.
- Francula-Zaninovic, S., & Nola, I. A. (2018). Management of measurable variable cardiovascular disease risk factors. *Current cardiology reviews*, *14*(3), 153-163.
- Frangogiannis, N. G. (2011). Pathophysiology of myocardial infarction. *Comprehensive Physiology*, *5*(4), 1841-1875.
- Fu, H. Y., Okada, K. I., Liao, Y., Tsukamoto, O., Isomura, T., Asai, M., ... & Minamino, T. (2010). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum–mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation*, *122*(4), 361-369.
- García-Padilla, C., Domínguez, J. N., Lodde, V., Munk, R., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., ... & Franco, D. (2022). Identification of atrial-enriched lncRNA Walras linked to cardiomyocyte cytoarchitecture and atrial fibrillation. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *36*(1), e22051.
- Garside, V. C., Chang, A. C., Karsan, A., & Hoodless, P. A. (2013). Co-ordinating Notch, BMP, and TGF- β signaling during heart valve development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *70*, 2899-2917.

- Giri, P., Mukhopadhyay, A., Gupta, M., & Mohapatra, B. (2022). Dilated cardiomyopathy: a new insight into the rare but common cause of heart failure. *Heart Failure Reviews*, 27(2), 431-454.
- Glavaški, M., Velicki, L., & Vučinić, N. (2023). Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetic Foundations, Outcomes, Interconnections, and Their Modifiers. *Medicina*, 59(8), 1424.
- Govindaraj, P., Rani, B., Sundaravadivel, P., Vanniarajan, A., Indumathi, K. P., Khan, N. A., ... & Thangaraj, K. (2019). Mitochondrial genome variations in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion*, 48, 51-59.
- Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Währisch, S., Beisaw, A., ... & Herrmann, B. G. (2013). The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Developmental cell*, 24(2), 206-214.
- Gudbjartsson, D. F., Arnar, D. O., Helgadóttir, A., Gretarsdóttir, S., Holm, H., Sigurdsson, A., ... & Stefansson, K. (2007). Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature*, 448(7151), 353-357.
- Günthel, M., BRNAett, P., & Christoffels, V. M. (2018). Development, proliferation, and growth of the mammalian heart. *Molecular Therapy*, 26(7), 1599-1609.
- Hamada, H., Suzuki, M., Yuasa, S., Mimura, N., Shinozuka, N., Takada, Y., ... & Aoe, T. (2004). Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Molecular and cellular biology*, 24(18), 8007-8017.
- Han, X., Zhang, J., Liu, Y., Fan, X., Ai, S., Luo, Y., ... & Shen, X. (2019). The lncRNA Hand2os1/Uph locus orchestrates heart development through regulation of precise expression of Hand2. *Development*, 146(13), dev176198.
- Harding, D., Chong, M. H., Lahoti, N., Bigogno, C. M., Prema, R., Mohiddin, S. A., & Marelli-Berg, F. (2023). Dilated cardiomyopathy and chronic cardiac inflammation: Pathogenesis, diagnosis and therapy. *Journal of internal medicine*, 293(1), 23-47.
- Harrelson, Z., Kelly, R. G., Goldin, S. N., Gibson-Brown, J. J., Bollag, R. J., Silver, L. M., & Papaioannou, V. E. (2004). Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development.
- Herman, A. B., Tsitsipatis, D., & Gorospe, M. (2022). Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation. *Molecular Cell*, 82(12), 2252-2266.
- Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R., & Lehrach, H. (1990). Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature*, 343(6259), 617-622.
- Heymans, S., Lakdawala, N. K., Tschöpe, C., & Klingel, K. (2023). Dilated cardiomyopathy: causes, mechanisms, and current and future treatment approaches. *The Lancet*, 402(10406), 998-1011.
- Hillary, R. F., & FitzGerald, U. (2018). A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of biomedical science*, 25, 1-10.

- Hindricks, G., Savelieva, I., & Camm, A. J. (2018). Atrial fibrillation: the era of scientific breakthrough. *EP Europace*, *20*(Fl_3), f275-f277.
- Hou, J., Long, H., Zhou, C., Zheng, S., Wu, H., Guo, T., ... & Wang, T. (2017). Long noncoding RNA Braveheart promotes cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*, *8*, 1-13.
- Huang, W., Gong, Y., & Yan, L. (2023). ER stress, the unfolded protein response and osteoclastogenesis: a review. *Biomolecules*, *13*(7), 1050.
- Hundscheid, I. H., Schellekens, D. H., Grootjans, J., Derikx, J. P., Buurman, W. A., Dejong, C. H., & Lenaerts, K. (2020). Females are more resistant to ischemia-reperfusion-induced intestinal injury than males: a human study. *Annals of surgery*, *272*(6), 1070-1079.
- Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y. P., Jiao, K., Schwartz, R. J., ... & Meyers, E. N. (2006). Fgf8 is required for anterior heart field development.
- Itoh, N., Ohta, H., Nakayama, Y., & Konishi, M. (2016). Roles of FGF signals in heart development, health, and disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, *4*, 110.
- Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y., Batts, L., Baldwin, H. S., & Hogan, B. L. (2003). An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. *Genes & development*, *17*(19), 2362-2367.
- Jin, J. K., Blackwood, E. A., Azizi, K., Thuerauf, D. J., Fahem, A. G., Hofmann, C., ... & Glembotski, C. C. (2017). ATF6 decreases myocardial ischemia/reperfusion damage and links ER stress and oxidative stress signaling pathways in the heart. *Circulation research*, *120*(5), 862-875.
- Kalayinia, S., Arjmand, F., Maleki, M., Malakootian, M., & Singh, C. P. (2021). MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease. *Cardiovascular Pathology*, *50*, 107296.
- Kataoka, M., Huang, Z. P., & Wang, D. Z. (2013). Build a braveheart: The missing linc (RNA). *Circulation research*, *112*(12), 1532-1534.
- Ke, H., Wang, X., Zhou, Z., Ai, W., Wu, Z., & Zhang, Y. (2021). Effect of weimaining on apoptosis and Caspase-3 expression in a breast cancer mouse model. *Journal of Ethnopharmacology*, *264*, 113363.
- Khan, A. W. (2021). Nuclear functions of microRNAs relevant to the cardiovascular system. *Translational Research*, *230*, 151-163.
- Khawaja, M., Siddiqui, R., Virani, S. S., Amos, C. I., Bandyopadhyay, D., Virk, H. U. H., ... & Krittanawong, C. (2023). Integrative genetic approach facilitates precision strategies for acute myocardial infarction. *Genes*, *14*(7), 1340.
- Kirchhof, P., Kahr, P. C., Kaese, S., Piccini, I., Vokshi, I., Scheld, H. H., ... & Brown, N. A. (2011). PITX2c is expressed in the adult left atrium, and reducing Pitx2c expression promotes atrial fibrillation inducibility and complex changes in gene expression. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *4*(2), 123-133.

- Klattenhoff, C. A., Scheuermann, J. C., Surface, L. E., Bradley, R. K., Fields, P. A., Steinhauser, M. L., ... & Boyer, L. A. (2013). Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, *152*(3), 570-583.
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. *Cell*, *172*(3), 393-407.
- Kretz, M., Siprashvili, Z., Chu, C., Webster, D. E., Zehnder, A., Qu, K., ... & Khavari, P. A. (2013). Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*, *493*(7431), 231-235.
- Kretz, M., Webster, D. E., Flockhart, R. J., Lee, C. S., Zehnder, A., Lopez-Pajares, V., ... & Khavari, P. A. (2012). Suppression of progenitor differentiation requires the long noncoding RNA ANCR. *Genes & development*, *26*(4), 338-343.
- Kristensen, L. S., Andersen, M. S., Stagsted, L. V., Ebbesen, K. K., Hansen, T. B., & Kjems, J. (2019). The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nature reviews genetics*, *20*(11), 675-691.
- Kubra, K. T., Akhter, M. S., Uddin, M. A., & Barabutis, N. (2020). Unfolded protein response in cardiovascular disease. *Cellular Signalling*, *73*, 109699.
- Kumarswamy, R., Bauters, C., Volkman, I., Maury, F., Fetisch, J., Holzmann, A., ... & Thum, T. (2014). Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. *Circulation research*, *114*(10), 1569-1575.
- Kurian, L., Aguirre, A., Sancho-Martinez, I., Benner, C., Hishida, T., Nguyen, T. B., ... & Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Identification of novel long noncoding RNAs underlying vertebrate cardiovascular development. *Circulation*, *131*(14), 1278-1290.
- Kuznetsova, T. (2018). Sex differences in epidemiology of cardiac and vascular disease. *Sex-specific analysis of cardiovascular function*, 61-70.
- Kwon, C., Arnold, J., Hsiao, E. C., Taketo, M. M., Conklin, B. R., & Srivastava, D. (2007). Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(26), 10894-10899.
- Lee, J. H., & Kwon, E. J. (2013). Calumenin has a role in the alleviation of ER stress in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, *439*(3), 327-332.
- Li, D., Sun, J., & Zhong, T. P. (2022). Wnt signaling in heart development and regeneration. *Current Cardiology Reports*, *24*(10), 1425-1438.
- Li, H., Zhan, J., Zhao, Y., Fan, J., Yuan, S., Yin, Z., ... & Wang, D. W. (2020). Identification of ncRNA-mediated functions of nucleus-localized miR-320 in cardiomyocytes. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *19*, 132-143.
- Li, J., Xie, J., Wang, Y. Z., Gan, Y. R., Wei, L., Ding, G. W., ... & Xie, D. X. (2021). Overexpression of lncRNA Dancr inhibits apoptosis and enhances autophagy to protect cardiomyocytes from endoplasmic reticulum stress injury via sponging microRNA-6324. *Molecular medicine reports*, *23*(2), 1-1.

- Li, X., Zhao, J., Geng, J., Chen, F., Wei, Z., Liu, C., ... & Xu, B. (2019). Long non-coding RNA MEG3 knockdown attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by targeting p53 following myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(12), 8369-8380.
- Liu, M., & Dudley Jr, S. C. (2018). The role of the unfolded protein response in arrhythmias. *Channels*, 12(1), 335-345.
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A. H., Qi, X., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & development*, 22(23), 3242-3254.
- Liu, Y. (2017). Earlier and broader roles of Mesp1 in cardiovascular development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(11), 1969-1983.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lozano-Velasco, E., Hernandez-Torres, F., Daimi, H., Serra, S. A., Herraiz, A., Hove-Madsen, L., ... & Franco, D. (2016). Pitx2 impairs calcium handling in a dose-dependent manner by modulating Wnt signalling. *Cardiovascular research*, 109(1), 55-66.
- Lozano-Velasco, E., Inácio, J. M., Sousa, I., Guimarães, A. R., Franco, D., Moura, G., & Belo, J. A. (2024). miRNAs in Heart Development and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1673.
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L., & Harvey, R. P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes & development*, 9(13), 1654-1666.
- Mao, Y., Liu, Y., Zhang, J., Zhu, Y., Chen, X., Sun, L., ... & Zhang, F. (2022). A nomogram predicting atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. *Chinese Medical Journal*, 135(08), 991-993.
- Maron, B. J., & Maron, M. S. (2013). Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet*, 381(9862), 242-255.
- Martens, L., Rühle, F., Witten, A., Meder, B., Katus, H. A., Arbustini, E., ... & Stoll, M. (2021). A genetic variant alters the secondary structure of the lncRNA H19 and is associated with dilated cardiomyopathy. *RNA biology*, 18(sup1), 409-415.
- Martinez-Amaro, F. J., Garcia-Padilla, C., Franco, D., & Daimi, H. (2023). LncRNAs and circRNAs in endoplasmic reticulum stress: A promising target for cardiovascular disease?. *International journal of molecular sciences*, 24(12), 9888.
- Materna, S. C., Sinha, T., BRNAes, R. M., van Bueren, K. L., & Black, B. L. (2019). Cardiovascular development and survival require Mef2c function in the myocardial but not the endothelial lineage. *Developmental biology*, 445(2), 170-177.
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., CRNAinci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., ... & Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges

- Merlo, M., Cannata, A., Gobbo, M., Stolfo, D., Elliott, P. M., & Sinagra, G. (2018). Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *European journal of heart failure*, *20*(2), 228-239.
- Millott, R., Dudek, E., & Michalak, M. (2012). The endoplasmic reticulum in cardiovascular health and disease. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *90*(9), 1209-1217.
- Mommersteeg, M. T., Brown, N. A., Prall, O. W., de Gier-de Vries, C., Harvey, R. P., Moorman, A. F., & Christoffels, V. M. (2007). Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circulation research*, *101*(9), 902-909.
- Mommersteeg, M. T., Hoogaars, W. M., Prall, O. W., De Gier-De Vries, C., Wiese, C., Clout, D. E., ... & Christoffels, V. M. (2007). Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circulation research*, *100*(3), 354-362.
- Muresan, I. D., & Agoston-Coldea, L. (2021). Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy: genetics, clinics, and modular imaging. *Heart Failure Reviews*, *26*(5), 1023-1036.
- Nakagawa, H., Umemura, A., Taniguchi, K., Font-Burgada, J., Dhar, D., Ogata, H., ... & Karin, M. (2014). ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer cell*, *26*(3), 331-343.
- Nakajima, Y., Sakabe, M., Matsui, H., Sakata, H., Yanagawa, N., & Yamagishi, T. (2009). Heart development before beating. *Anatomical science international*, *84*, 67-76.
- Nemeth, K., Bayraktar, R., Ferracin, M., & Calin, G. A. (2024). Non-coding RNAs in disease: from mechanisms to therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, *25*(3), 211-232.
- Nie, X., Fan, J., Dai, B., Wen, Z., Li, H., Chen, C., & Wang, D. W. (2024). LncRNA CHKB-DT Downregulation Enhances Dilated Cardiomyopathy Through ALDH2. *Circulation Research*, *134*(4), 425-441.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., ... & Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & development*, *16*(11), 1345-1355.
- Niu, Z., Iyer, D., Conway, S. J., Martin, J. F., Ivey, K., Srivastava, D., ... & Schwartz, R. J. (2008). Serum response factor orchestrates nascent sarcomerogenesis and silences the biomineralization gene program in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(46), 17824-17829.
- Nuzzi, V., Cannatà, A., Manca, P., Castrichini, M., Barbati, G., Aleksova, A., ... & Sinagra, G. (2021). Atrial fibrillation in dilated cardiomyopathy: Outcome prediction from an observational registry. *International Journal of Cardiology*, *323*, 140-147.
- Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *10*, 173-194.

- Okada, K. I., Minamino, T., Tsukamoto, Y., Liao, Y., Tsukamoto, O., Takashima, S., ... & Kitakaze, M. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*, *110*(6), 705-712.
- Olivotto, I., Girolami, F., Nistri, S., Rossi, A., Rega, L., Garbini, F., ... & Yacoub, M. H. (2009). The many faces of hypertrophic cardiomyopathy: from developmental biology to clinical practice. *Journal of cardiovascular translational research*, *2*, 349-367.
- Ortega, A., Roselló-Lletí, E., Tarazón, E., Molina-Navarro, M. M., Martínez-Dolz, L., González-Juanatey, J. R., ... & Portolés, M. (2014). Endoplasmic reticulum stress induces different molecular structural alterations in human dilated and ischemic cardiomyopathy. *PLoS One*, *9*(9), e107635.
- Ounzain, S., Micheletti, R., Arnan, C., Plaisance, I., Cecchi, D., Schroen, B., Reverter, F., Alexanian, M., Gonzales, C., Ng, S.Y., Bussotti, G., Pezzuto, I., Notredame, C., Heymans, S., Guigó, R., Johnson, R., and Pedrazzini, T. (2015). CARMEN, a human super enhancer-associated long noncoding RNA controlling cardiac specification, differentiation and homeostasis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *89*, 98-112.
- Panda, A. C., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2016). Affinity pulldown of biotinylated RNA for detection of protein-RNA complexes. *Bio-protocol*, *6*(24), e2062-e2062.
- Panni, S., Lovering, R. C., Porras, P., & Orchard, S. (2020). Non-coding RNA regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1863*(6), 194417.
- Peterkin, T., Gibson, A., Loose, M., & Patient, R. (2005, February). The roles of GATA-4,-5 and-6 in vertebrate heart development. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 16, No. 1, pp. 83-94). Academic Press.
- Pietrafesa, G., De Zio, R., Scorza, S. I., Armentano, M. F., Pepe, M., Forleo, C., ... & Carmosino, M. (2023). Targeting unfolded protein response reverts ER stress and ER Ca²⁺ homeostasis in cardiomyocytes expressing the pathogenic variant of Lamin A/C R321X. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 340.
- Plageman Jr, T. F., & Yutzey, K. E. (2005). T-box genes and heart development: Putting the "T" in heart. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, *232*(1), 11-20.
- Qiu, Z., Chen, W., Liu, Y., Jiang, B., Yin, L., & Chen, X. (2021). LncRNA AC061961. 2 overexpression inhibited endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dilated cardiomyopathy rats and cardiomyocytes via activating wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, *41*(5), 494-503.
- Qiu, Z., Chen, W., Liu, Y., Jiang, B., Yin, L., & Chen, X. (2021). LncRNA AC061961. 2 overexpression inhibited endoplasmic reticulum stress induced apoptosis in dilated cardiomyopathy rats and cardiomyocytes via activating wnt/ β -catenin pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, *41*(5), 494-503.

- Rackham, O., Shearwood, A. M. J., Mercer, T. R., Davies, S. M., Mattick, J. S., & Filipovska, A. (2011). Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *Rna*, *17*(12), 2085-2093.
- Ramaccini, D., Montoya-Urbe, V., Aan, F. J., Modesti, L., Potes, Y., Wieckowski, M. R., ... & Matter, M. L. (2021). Mitochondrial function and dysfunction in dilated cardiomyopathy. *Frontiers in cell and developmental biology*, *8*, 624216.
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, *11*(11), 1956-1977.
- Regitz-Zagrosek, V., & Kararigas, G. (2016). Mechanistic pathways of sex differences in cardiovascular disease. *Physiological reviews*.
- Reichart, D., Magnussen, C., Zeller, T., & Blankenberg, S. (2019). Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: a translational review of current literature. *Journal of internal medicine*, *286*(4), 362-372.
- Ren, J., Bi, Y., Sowers, J. R., Hetz, C., & Zhang, Y. (2021). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology*, *18*(7), 499-521.
- Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). The Wnt pathway: from signaling mechanisms to synthetic modulators. *Annual review of biochemistry*, *91*(1), 571-598.
- Risebro, C. A., Smart, N., Dupays, L., Breckenridge, R., Mohun, T. J., & Riley, P. R. (2006). Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart.
- Roberts, T. C. (2014). The microRNA biology of the mammalian nucleus. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, *3*.
- Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. J. C. M. (2016). The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress. *Current molecular medicine*, *16*(6), 533-544.
- Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and molecular life sciences*, *73*, 2491-2509.
- Serrano-Negrón, J. E., Zhang, Z., Rivera-Ruiz, A. P., Banerjee, A., Romero-Nutz, E. C., Sánchez-Torres, N., ... & Banerjee, D. K. (2018). Tunicamycin-induced ER stress in breast cancer cells neither expresses GRP78 on the surface nor secretes it into the media. *Glycobiology*, *28*(2), 61-68.
- Sessa, F., Chisari, M., Salerno, M., Esposito, M., Zuccarello, P., Capasso, E., ... & Cocimano, G. (2024). Congenital heart diseases (CHDs) and forensic investigations: Searching for the cause of death. *Experimental and Molecular Pathology*, *137*, 104907.
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., ... & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic acids research*, *50*(W1), W216-W221.

- Silva-Palacios, A., Zazueta, C., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). ER membranes associated with mitochondria: possible therapeutic targets in heart-associated diseases. *Pharmacological Research*, *156*, 104758.
- Soares, P., Rocha, G., Pissarra, S., Soares, H., Flôr-de-Lima, F., Costa, S., ... & Guimarães, H. (2017). Neonatal dilated cardiomyopathy. *Revista portuguesa de cardiologia*, *36*(3), 201-214.
- Sun, R., Liu, M., Lu, L., Zheng, Y., & Zhang, P. (2015). Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. *Cell biochemistry and biophysics*, *72*, 857-860.
- Szafranski, P., & Stankiewicz, P. (2021). Long non-coding RNA FENDRR: gene structure, expression, and biological relevance. *Genes*, *12*(2), 177.
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., ... & Von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic acids research*, *51*(D1), D638-D646.
- Tarifa, C., Serra, S. A., Herraiz-Martínez, A., Lozano-Velasco, E., Benítez, R., Aranega, A., ... & Hove-Madsen, L. (2023). Pitx2c deficiency confers cellular electrophysiological hallmarks of atrial fibrillation to isolated atrial myocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *162*, 114577.
- Tirdea, C., Hostiuc, S., Moldovan, H., & Scafa-Udriste, A. (2022). Identification of Risk Genes Associated with Myocardial Infarction—Big Data Analysis and Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23), 15008.
- Toro, R., Pérez-Serra, A., Mangas, A., Campuzano, O., Sarquella-Brugada, G., Quezada-Feijoo, M., ... & Bonet, F. (2022). miR-16-5p suppression protects human cardiomyocytes against endoplasmic reticulum and oxidative stress-induced injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1036.
- Tuohy, C. V., Kaul, S., Song, H. K., Nazer, B., & Heitner, S. B. (2020). Hypertrophic cardiomyopathy: the future of treatment. *European journal of heart failure*, *22*(2), 228-240.
- Tzahor, E. (2007). Wnt/ β -catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter. *Developmental cell*, *13*(1), 10-13.
- Waldo, K. L., Kumiski, D. H., Wallis, K. T., Stadt, H. A., Hutson, M. R., Platt, D. H., & Kirby, M. L. (2001). Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field.
- Walter, P & Ron, D (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to. *science*, *1209038*(1081), 334.
- Wang, J., Klysik, E., Sood, S., Johnson, R. L., Wehrens, X. H., & Martin, J. F. (2010). Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(21), 9753-9758.
- Wang, J., Klysik, E., Sood, S., Johnson, R. L., Wehrens, X. H., & Martin, J. F. (2010). Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(21), 9753-9758.

- Wang, Y., Sun, X., & Sun, X. (2022). The functions of long non-coding RNA (lncRNA) H19 in the heart. *Heart, Lung and Circulation*, *31*(3), 341-349.
- Watanabe, Y., Miyagawa-Tomita, S., Vincent, S. D., Kelly, R. G., Moon, A. M., & Buckingham, M. E. (2010). Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. *Circulation research*, *106*(3), 495-503.
- Watt, A. J., Battle, M. A., Li, J., & Duncan, S. A. (2004). GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(34), 12573-12578.
- Weintraub, R. G., Semsarian, C., & Macdonald, P. (2017). Dilated cardiomyopathy. *The Lancet*, *390*(10092), 400-414.
- Weintraub, R. G., Semsarian, C., & Macdonald, P. (2017). Dilated cardiomyopathy. *The Lancet*, *390*(10092), 400-414.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., & Hogan, B. L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & development*, *9*(17), 2105-2116.
- Wu, W., Ziemann, M., Huynh, K., She, G., Pang, Z. D., Zhang, Y., ... & Du, X. J. (2021). Activation of Hippo signaling pathway mediates mitochondria dysfunction and dilated cardiomyopathy in mice. *Theranostics*, *11*(18), 8993.
- Xiao, T., Liang, X., Liu, H., Zhang, F., Meng, W., & Hu, F. (2020). Mitochondrial stress protein HSP60 regulates ER stress-induced hepatic lipogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*, *64*(2), 67-75.
- Yan, S., & Jiao, K. (2016). Functions of miRNAs during mammalian heart development. *International journal of molecular sciences*, *17*(5), 789.
- Zhang, B., Bao, W., Zhang, S., Chen, B., Zhou, X., Zhao, J., ... & Wang, Y. (2022). LncRNA HEPFAL accelerates ferroptosis in hepatocellular carcinoma by regulating SLC7A11 ubiquitination. *Cell death & disease*, *13*(8), 734.
- Zhang, L., Nomura-Kitabayashi, A., Sultana, N., Cai, W., Cai, X., Moon, A. M., & Cai, C. L. (2014). Mesodermal Nkx2. 5 is necessary and sufficient for early second heart field development. *Developmental biology*, *390*(1), 68-79.
- Zhang, M., Hill, M. C., Kadow, Z. A., Suh, J. H., Tucker, N. R., Hall, A. W., ... & Martin, J. F. (2019). Long-range Pitx2c enhancer–promoter interactions prevent predisposition to atrial fibrillation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(45), 22692-22698.
- Zhang, M., Wei, J., Li, Y., Shan, H., Yan, R., Lin, L., ... & Xue, J. (2014). Novel distribution of calreticulin to cardiomyocyte mitochondria and its increase in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *449*(1), 62-68.
- Zhang, X., Zhu, J. X., Ma, Z. G., Wu, H. M., Xu, S. C., Song, P., ... & Tang, Q. Z. (2019). Rosmarinic acid alleviates cardiomyocyte apoptosis via cardiac fibroblast in

doxorubicin-induced cardiotoxicity. *International Journal of Biological Sciences*, 15(3), 556.

Zhu, C., Wang, M., Yu, X., Shui, X., Tang, L., Chen, Z., & Xiong, Z. (2022). lncRNA NBR2 attenuates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy through repressing ER stress via activating LKB1/AMPK/Sirt1 pathway. *Bioengineered*, 13(5), 13667-13679.

Zhu, J., Wang, H., & Chen, H. (2021). Effects of estrogen on cardiac mRNA and lncRNA expression profiles in hypertensive mice. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 14, 706-727.

Zimmerman, Z. F., Moon, R. T., & Chien, A. J. (2012). Targeting Wnt pathways in disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a008086.

ANEXO

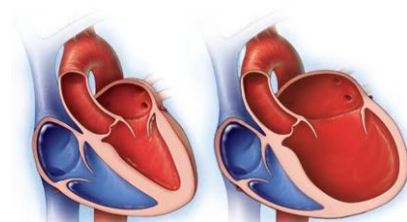


TABLA SUPLEMENTARIA 1: Primers usados en este estudio

Nombre del gen	Secuencia	Especie
Walras/Gm44934 F	GCTACAATGGAGGGCTTCAG	Mus musculus
Walras/Gm44934 R	CAGCTTCTTCATGGCCTCAT	Mus musculus
Gm26538 F	ACASGCAAAGGATTGGTGAGC	Mus musculus
Gm26538 R	TTACAGAAGAGCCTGCCACA	Mus musculus
Walaa/Gm 45188 F	ACAGAGAATACGGGCACACC	Mus musculus
Walaa/Gm 45188 R	TCAGAGGAGCTTCCGAGAAA	Mus musculus
Walrad/Gm44653 F	GGTTCTGAAGAGGGCAAAGA	Mus musculus
Walrad/Gm44653 R	CCACTACCATAGGGGCTGTG	Mus musculus
Wallrd/2010110K18Rik F	GCTGAGACCGATGAAGTGGT	Mus musculus
Wallrd/2010110K18Rik R	CATCCTTGTGGCTGCCTACA	Mus musculus
ATF6 F	TACCACCCACAACAAGACCA	Mus musculus
ATF6 R	TGATGATCCCGGAGATAAGG	Mus musculus
IRE1 F	CGAATAGAAAAGGAGGCCTTG	Mus musculus
IRE1 R	CTCGGAGGAGGTCTCTCACA	Mus musculus
PERK F	TTCATGGAAACA ACTACTCCATA	Mus musculus
PERK R	TGGGGATATTTCTGAGTGAACA	Mus musculus
BIP F	CAGATCTTCCACGGCTTC	Mus musculus
BIP R	TTCAGCTGTCACTCGGAGAA	Mus musculus
ATF4 F	GAAACCTCATGGGTTCTCCA	Mus musculus
ATF4 R	AGAGCTCATCTGGCATGGTT	Mus musculus
Bcl-2 F	AGTACCTGAACCGGCATCTG	Mus musculus
Bcl-2 R	CAGGTATGCACCCAGAGTGA	Mus musculus

Caluminina F	TCGAGATAAGAACCGGGATG	Mus musculus
Caluminina R	CTGGCTGCCACAAATAAAT	Mus musculus
P53 F	GCGTAAACGCTTCGAGATGT	Mus musculus
P53 R	CCCCACTTTCTTGACCATTG	Mus musculus
Chop F	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	Mus musculus
Chop R	GGACGCAGGGTCAAGAGTAG	Mus musculus
Xbp1 F	TCCGCAGCACTCAGACTATG	Mus musculus
Xbp1 R	ACAGGGTCCAACCTGTCCAG	Mus musculus
LINC02761 F	CCAGAGGCTGAGTGACTTCC	Homo sapiens
LINC02761 R	CGCAGCGTGGTTACTGTAGA	Homo sapiens
AP002340.1 F	TTACAGGTGTGAGCCACAGG	Homo sapiens
AP002340.1 R	CCAGAGGCAACGAGAAAATGC	Homo sapiens
ATF6 F	TCTCGTGGCCTTCTGTTCT	Homo sapiens
ATF6 R	ACCCACCTTTTCACCTGGAA	Homo sapiens
IRE1 F	CCTGGGGCAAGAGGTAAAGA	Homo sapiens
IRE1 R	AGTTTGACTGCCTACTCGCT	Homo sapiens
PERK F	AGACATGCTCTCTCCATCCC	Homo sapiens
PERK R	AGGGCTATGGGAGTTGTTGG	Homo sapiens

Tabla suplementaria 2: Proteínas que interactúan con *LINC02761*

<u>UniprotKB-ID</u>	<u>Gene</u>	<u>Short-name</u>	<u>Gene ontology</u>
P42025	ACTR1B	Beta-centractin	Component of a multi-subunit complex involved in microtubule based vesicle motility
P68032	ACTC1	Actin, alpha cardiac muscle 1	Involved in various types of cell motility and are ubiquitously expressed in all eukaryotic cells.
P61163	ACTR1A	Alpha-centractin	Part of the ACTR1A/ACTB filament around which the dynactin complex is built
P43686	PSMC4	26S proteasome regulatory subunit 6B	Component of the 26S proteasome,
P14174	MIF	Macrophage migration inhibitory factor	Pro-inflammatory cytokine involved in the innate immune response to bacterial pathogens
Q15459	SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome
Q7RTV0	PHF5A	PHD finger-like domain-containing protein 5A	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome
P22087	FBL	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase that has the ability to methylate both RNAs and proteins
P19525	EIF2AK2	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	IFN-induced dsRNA-dependent serine/threonine-protein kinase that phosphorylates the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (EIF2S1/eIF-2-alpha)
Q7Z2W4	ZC3HAV1	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	Inhibits the replication of viruses by recruiting the cellular RNA degradation machineries to degrade the viral mRNAs
P09012	SNRPA	U1 small nuclear ribonucleoprotein A	Component of the spliceosomal U1 snRNP, which is essential for recognition of the pre-mRNA 5' splice-site and the subsequent assembly of the spliceosome
Q9Y2R9	MRPS7	Small ribosomal subunit protein uS7m	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q96N67	DOCK7	Dedicator of cytokinesis protein 7	Functions as a guanine nucleotide exchange factor (GEF)
P48668	KRT6C	Keratin, type II cytoskeletal 6C	intermediate filament
Q96EY7	PTCD3	Small ribosomal subunit protein mS39	Mitochondrial RNA-binding protein that has a role in mitochondrial translation
P01116	KRAS	GTPase KRas	Ras proteins bind GDP/GTP and possess intrinsic GTPase activity
P42704	LRPPRC	Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	ay play a role in RNA metabolism in both nuclei and mitochondria
P40763	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Signal transducer and transcription activator that mediates cellular responses to interleukins, KITLG/SCF, LEP and other growth factors

P22695	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Component of the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase
Q15427	SF3B4	Splicing factor 3B subunit 4	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome
Q9GZU7	CTDSP1	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase 1	Preferentially catalyzes the dephosphorylation of 'Ser-5' within the tandem 7 residue repeats in the C-terminal domain (CTD) of the largest RNA polymerase II subunit POLR2A
Q9Y2Q9	MRPS28	Small ribosomal subunit protein bS1m	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q01081	U2AF1	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	Constitutive and enhancer-dependent splicing by mediating protein-protein interactions and protein-RNA interactions required for accurate 3'-splice site selection
P15104	GLUL	Glutamine synthetase	Catalyzes the ATP-dependent conversion of glutamate and ammonia to glutamine
Q9H0U4	RAB1B	Ras-related protein Rab-1B	The small GTPases Rab are key regulators of intracellular membrane trafficking,
Q13435	SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome,
P52272	HNRNPM	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Pre-mRNA binding protein in vivo, binds avidly to poly(G) and poly(U) RNA homopolymers in vitro. Involved in splicing
Q92522	H1-10	Histone H1.10	Condensation of nucleosome chains into higher-order structures
Q00577	PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Transcription activator that specifically binds the purine-rich single strand of the PUR element located upstream of the MYC gene
Q14444	CAPRIN1	Caprin-1	Regulator of mRNAs transport, translation and/or stability,
P62316	SNRPD2	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	Pre-mRNA splicing as a core component of the spliceosomal U1, U2, U4 and U5 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs),
O15355	PPM1G	Protein phosphatase 1G	Protein serine/threonine phosphatase activity
P14324	FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthase	Isoprenoid biosynthesis which catalyzes the formation of farnesyl diphosphate (FPP)
P36542	ATP5F1C	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	Mitochondrial membrane ATP synthase (F1FO ATP synthase or Complex V)
P51114	FXR1	RNA-binding protein FXR1	Regulator of mRNAs translation and/or stability
P31948	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Acts as a co-chaperone for HSP90AA1
P26358	DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	Methylates CpG residues. Preferentially methylates hemimethylated DNA

P61020	RAB5B	Ras-related protein Rab-5B	Protein transport. Probably involved in vesicular traffic
Q92974	ARHGEF2	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Activates Rho-GTPases by promoting the exchange of GDP for GTP
Q9BZX2	UCK2	Uridine-cytidine kinase 2	Phosphorylates uridine and cytidine to uridine monophosphate and cytidine monophosphate
P51398	DAP3	Small ribosomal subunit protein mS29	Involved in mediating interferon-gamma-induced cell death.
P24539	ATP5PB	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	Mitochondrial membrane ATP synthase (F1F0 ATP synthase or Complex V)
Q12874	SF3A3	Splicing factor 3A subunit 3	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome,
Q13347	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	Component of the eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) complex,
P41252	IARS1	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic	Catalyzes the specific attachment of an amino acid to its cognate tRNA
Q5T8D3	ACBD5	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	Peroxisome receptor for pexophagy but is dispensable for aggrephagy and nonselective autophagy. Binds medium- and long-chain acyl-CoA esters
Q14247	CTTN	Src substrate cortactin	Contributes to the organization of the actin cytoskeleton and cell shape
P40938	RFC3	Replication factor C subunit 3	The elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon
P40939	HADHA	Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial	Mitochondrial trifunctional enzyme catalyzes the last three of the four reactions of the mitochondrial beta-oxidation pathway
Q5VTR2	RNF20	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	Component of the RNF20/40 E3 ubiquitin-protein ligase complex that mediates monoubiquitination of 'Lys-120' of histone H2B
P50570	DNM2	Dynamin-2	Catalyzes the hydrolysis of GTP and utilizes this energy to mediate vesicle scission at plasma membrane during endocytosis and filament remodeling at many actin structures during organization of the actin cytoskeleton
Q00341	HDLBP	Vigilin	Appears to play a role in cell sterol metabolism. It may function to protect cells from over-accumulation of cholesterol
Q96QR8	PURB	Transcriptional regulator protein Pur-beta	Transcriptional regulator which can act as an activator or a repressor
Q92945	KHSRP	Far upstream element-binding protein 2	Binds to the dendritic targeting element and may play a role in mRNA trafficking

P09211	GSTP1	Glutathione S-transferase P	Conjugation of reduced glutathione to a wide number of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles
O60716	CTNND1	Catenin delta-1	Key regulator of cell-cell adhesion
P62899	RPL31	Large ribosomal subunit protein eL31	Component of the large ribosomal subunit
Q12906	ILF3	Interleukin enhancer-binding factor 3	Essential role in the biogenesis of circular RNAs (circRNAs)
Q99873	PRMT1	Protein arginine N-methyltransferase 1	Methylates (mono and asymmetric dimethylation) the guanidino nitrogens of arginyl residues present in proteins
P09467	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	Catalyzes the hydrolysis of fructose 1,6-bisphosphate to fructose 6-phosphate
P40937	RFC5	Replication factor C subunit 5	Elongation of primed DNA templates by DNA polymerase delta and epsilon
Q8WUM4	PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein	Endocytosis, multivesicular body biogenesis, membrane repair, cytokinesis, apoptosis and maintenance of tight junction integrity
Q16181	SEPTIN7	Septin-7	Filament-forming cytoskeletal GTPase.
P62847	RPS24	Small ribosomal subunit protein eS24	Component of the small ribosomal subunit
P62995	TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	Sequence-specific RNA-binding protein which participates in the control of pre-mRNA splicing
P82650	MRPS22	Small ribosomal subunit protein mS22	Mitochondrial small ribosomal subunit
P38398	BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	E3 ubiquitin-protein ligase that specifically mediates the formation of 'Lys-6'-linked polyubiquitin chains and plays a central role in DNA repair
Q00535	CDK5	Cyclin-dependent kinase 5	Proline-directed serine/threonine-protein kinase
P63244	RACK1	Small ribosomal subunit protein RACK1	Scaffolding protein involved in the recruitment, assembly and/or regulation of a variety of signaling molecules.
P52292	KPNA2	Importin subunit alpha-1	Functions in nuclear protein import as an adapter protein for nuclear receptor KPNB1
P49748	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Catalyze the first step of mitochondrial fatty acid beta-oxidation
Q15020	SART3	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3	U6 snRNP-binding protein that functions as a recycling factor of the splicing machinery.
P78347	GTF2I	General transcription factor II-I	Interacts with the basal transcription machinery by coordinating the formation of a multiprotein complex at the C-FOS promoter, and linking specific signal responsive activator complexes

P46782	RPS5	Small ribosomal subunit protein uS7	Component of the small ribosomal subunit
P25205	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	Component of the MCM2-7 complex (MCM complex)
P17980	PSMC3	26S proteasome regulatory subunit 6A	Component of the 26S proteasome, a multiprotein complex involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins
Q2M389	WASHC4	WASH complex subunit 4	Component of the WASH core complex
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta	Involved in oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues
P62081	RPS7	Small ribosomal subunit protein eS7	Component of the small ribosomal subunit
P78368	CSNK1G2	Casein kinase I isoform gamma-2	Serine/threonine-protein kinase
P04350	TUBB4A	Tubulin beta-4A chain	Tubulin beta-4A chain
P27482	CALML3	Calmodulin-like protein 3	Specific light chain of unconventional myosin-10 (MYO10), also enhances MYO10 translation, possibly by acting as a chaperone for the emerging MYO10 heavy chain protein
Q9Y608	LRRFIP2	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	Activator of the canonical Wnt signaling pathway
Q13162	PRDX4	Peroxiredoxin-4	Catalyzes the reduction of hydrogen peroxide
Q15043	SLC39A14	Metal cation symporter ZIP14	Electroneutral transporter of the plasma membrane
P28332	ADH6	Alcohol dehydrogenase 6	Alcohol dehydrogenase
Q9Y3F4	STRAP	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	Catalyzes the assembly of small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs)
Q13137	CALCOCO2	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2	Required for autophagy-mediated intracellular bacteria degradation
Q14677	CLINT1	Clathrin interactor 1	Binds to membranes enriched in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P2).
Q3ZCQ8	TIMM50	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50	Essential component of the TIM23 complex
P14314	PRKCSH	Glucosidase 2 subunit beta	Regulatory subunit of glucosidase II
Q07866	KLC1	Kinesin light chain 1	Microtubule-associated force-producing protein that may play a role in organelle transport
P82930	MRPS34	Small ribosomal subunit protein mS34	Mitochondrial translation

P82663	MRPS25	Small ribosomal subunit protein mS25	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q53GQ0	HSD17B12	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	Catalyzes the second of the four reactions of the long-chain fatty acids elongation cycle
Q9Y2R5	MRPS17	Small ribosomal subunit protein uS17m	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q9Y3D5	MRPS18C	Small ribosomal subunit protein bS18m	There are 3 mitochondrial isoforms of bS18 in mammalia, localizing to 3 distinct sites in the mitoribosome
Q6P5R6	RPL22L1	Ribosomal protein eL22-like	Ribonucleoprotein complex
Q9BYN8	MRPS26	Small ribosomal subunit protein mS26	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q5T653	MRPL2	Large ribosomal subunit protein uL2m	Mitochondrial large ribosomal subunit
O60783	MRPS14	Small ribosomal subunit protein uS14m	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q92552	MRPS27	Small ribosomal subunit protein mS27	Mitochondrial small ribosomal subunit
Q9BZE1	MRPL37	Large ribosomal subunit protein mL37	Mitochondrial large ribosomal subunit
Q5PSV4	BRMS1L	Breast cancer metastasis-suppressor 1-like protein	Histone deacetylase (HDAC1)-dependent transcriptional repression activity.
O14735	CDIPT	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase	Catalyzes the biosynthesis of phosphatidylinositol (PtdIns)
Q9Y646	CPQ	Carboxypeptidase Q	Carboxypeptidase that may play an important role in the hydrolysis of circulating peptides
Q9Y3C5	RNF11	RING finger protein 11	Ubiquitin-editing protein complex
P61224	RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	GTP-binding protein that possesses intrinsic GTPase activity.
P61204	ARF3	ADP-ribosylation factor 3	Involved in protein trafficking; may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus
Q5M775	SPECC1	Cytospin-B	Actin cytoskeleton organization
O75326	SEMA7A	Semaphorin-7A	Integrin-mediated signaling and functions
Q8NHY3	GAS2L2	GAS2-like protein 2	Cross-linking of microtubules and microfilaments
Q15629	TRAM1	Translocating chain-associated membrane protein 1	Translocation of nascent protein chains into or through the endoplasmic reticulum (ER) membrane
Q9NZN4	EHD2	EH domain-containing protein 2	ATP- and membrane-binding protein that controls membrane reorganization/tubulation upon ATP hydrolysis
Q93050	ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 1	Subunit of the V0 complex of vacuolar(H ⁺)-ATPase (V-ATPase)
Q6ZNI9	ZNF841	Zinc finger protein 841	Involved in transcriptional regulation
P19022	CDH2	Cadherin-2	Calcium-dependent cell adhesion protein

P21281	ATP6V1B2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Non-catalytic subunit of the V1 complex of vacuolar(H ⁺)-ATPase (V-ATPase)
P15259	PGAM2	Phosphoglycerate mutase 2	Interconversion of 3- and 2-phosphoglycerate with 2,3-bisphosphoglycerate
O14773	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	Lysosomal serine protease with tripeptidyl-peptidase I activity
Q9HBG4	ATP6V0A4	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a 4	Subunit of the V0 complex of vacuolar(H ⁺)-ATPase (V-ATPase),
P69905	HBA1; HBA2	Hemoglobin subunit alpha	Oxygen transport from the lung to the various peripheral tissues
Q15021	NCAPD2	Condensin complex subunit 1	Regulatory subunit of the condensin complex
Q01546	KRT76	Keratin, type II cytoskeletal 2	Terminal cornification
Q9Y388	RBMX2	RNA-binding motif protein, X-linked 2	Involved in pre-mRNA splicing as component of the activated spliceosome
Q6P9B6	MEAK7	MTOR-associated protein MEAK7	Activates an alternative mTOR signaling to regulate cell proliferation and migration
Q9NX58	LYAR	Cell growth-regulating nucleolar protein	Processing of 47S/45S pre-rRNA to 32S/30S pre-rRNAs and their subsequent processing to produce 18S and 28S rRNAs
Q7Z7G8	VPS13B	Intermembrane lipid transfer protein VPS13B	Mediates the transfer of lipids between membranes at organelle contact sites
Q5SW79	CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	Plays a role in microtubule organization
Q9UPE1	SRPK3	SRSF protein kinase 3	Serine/arginine-rich protein-specific kinase which specifically phosphorylates its substrates at serine residues located in regions rich in arginine/serine dipeptides, known as RS domains
P22694	PRKACB	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	Mediates cAMP-dependent signaling triggered by receptor binding to GPCRs
O15260	SURF4	Surfeit locus protein 4	Endoplasmic reticulum cargo receptor that mediates the export of lipoproteins
P49006	MARCKSL1	MARCKS-related protein	Controls cell movement by regulating actin cytoskeleton homeostasis and filopodium and lamellipodium formation
Q15477	SKIC2	Superkiller complex protein 2	Helicase component of the SKI complex
P33316	DUT	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mitochondrial	Catalyzes the cleavage of 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP) into 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP) and inorganic pyrophosphate
Q86T96	RNF180	E3 ubiquitin-protein ligase RNF180	Promotes polyubiquitination and degradation by the proteasome pathway of ZIC2
Q9NY35	CLDND1	Claudin domain-containing protein 1	Apical plasma membrane

Q9H7Y0	DIPK2B	Divergent protein kinase domain 2B	Extracellular region
P54098	POLG	DNA polymerase subunit gamma-1	Catalytic subunit of DNA polymerase gamma solely responsible for replication of mitochondrial DNA (mtDNA)
Q9UBS4	DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11	Required for proper folding, trafficking or degradation of proteins
Q03519	TAP2	Antigen peptide transporter 2	ABC transporter associated with antigen processing
Q8NDY3	ADPRHL1	Inactive ADP-ribosyltransferase ARH2	Required for myofibril assembly and outgrowth of the cardiac chambers in the developing heart

Tabla suplementaria 2: Proteínas que interactúan con *APO02340.1*

UniprotKB-ID	Gene	Short-name	Gene ontology (roles)
P17174	GOT1	Aspartate aminotransferase,	Hepatic glucose synthesis during development and in adipocyte glyceroneogenesis.
Q01995	TAGLN	Transgelin	Calcium interactions and contractile properties of the cell
Q9NXE4	SMPD4	Sphingomyelin phosphodiesterase 4	Hydrolysis of membrane sphingomyelin to form phosphorylcholine and ceramide
Q08431	MFGE8	Lactadherin	Maintenance of intestinal epithelial homeostasis and the promotion of mucosal healing
P05198	EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	Member of the eIF2 complex that functions in the early steps of protein synthesis by forming a ternary complex with GTP and initiator tRNA
P02549	SPTA1	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	Cytoskeletal superstructure of the erythrocyte plasma membrane
Q9NRL2	BAZ1A	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A	Regulatory subunit of the ATP-dependent ACF-1 and ACF-5 ISWI chromatin remodeling complexes
Q9UQ35	SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Required for pre-mRNA splicing as component of the spliceosome
O75569	PRKRA	Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A	Activates EIF2AK2/PKR in the absence of double-stranded RNA
P52732	KIF11	Kinesin-like protein KIF11	Motor protein required for establishing a bipolar spindle and thus contributing to chromosome congression during mitosis
Q7L014	DDX46	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	Component of the 17S U2 SnRNP complex of the spliceosome,
P55795	HNRNPH2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Component of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes
Q96RQ1	ERGIC2	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 2	Transport between endoplasmic reticulum and Golgi
O95793	STAU1	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	Binds double-stranded RNA (regardless of the sequence) and tubulin
Q9Y305	ACOT9	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	Catalyze the hydrolysis of acyl-CoAs to the free fatty acid and coenzyme A (CoASH),
Q8IUH3	RBM45	RNA-binding protein 45	RNA-binding protein with binding specificity for poly(C)
Q9Y295	DRG1	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	Catalyzes the conversion of GTP to GDP through hydrolysis of the gamma-phosphate bond in GTP
P16070	CD44	CD44 antigen	Cell-surface receptor that plays a role in cell-cell interactions, cell adhesion and migration,

P62140	PPP1CB	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	Protein phosphatase that associates with over 200 regulatory proteins to form highly specific holoenzymes which dephosphorylate hundreds of biological targets
Q96MV8	ZDHHC15	Palmitoyltransferase ZDHHC15	Catalyzes the addition of palmitate onto various protein substrates
Q9Y581	INSL6	Insulin-like peptide INSL6	Sperm development and fertilization
P04746	AMY2A	Pancreatic alpha-amylase	Catalytic activity
P19087	GNAT2	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-2	Modulators or transducers in various transmembrane signaling systems
P23634	ATP2B4	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	Catalyzes the hydrolysis of ATP coupled with the transport of calcium out of the cell
Q6ZV73	FGD6	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6	Regulate the actin cytoskeleton and cell shape
P15085	CPA1	Carboxypeptidase A1	Catalyzes the release of a C-terminal amino acid, but has little or no action with -Asp, -Glu, -Arg, -Lys or -Pro
O95932	TGM6	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 6	Catalyzes the cross-linking of proteins and the conjugation of polyamines to proteins
Q92599	SEPTIN8	Septin-8	Filament-forming cytoskeletal GTPase
P62879	GNB2	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	Modulator or transducer in various transmembrane signaling systems
P43304	GPD2	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	Calcium-responsive mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase
Q7L2E3	DHX30	ATP-dependent RNA helicase DHX30	RNA-dependent helicase
Q9NVD7	PARVA	Alpha-parvin	Sarcomere organization and in smooth muscle cell contraction
A6NCM1	IQCA1L	IQ and AAA domain-containing protein 1-like	Microtubule severing ATPase activity
Q86SE5	RALYL	RNA-binding Raly-like protein	RNA binding
Q67FW5	B3GNTL1	Queuosine-tRNA galactosyltransferase	Catalyzes galactosylation of cytoplasmic tRNA(Tyr)
Q7Z5J4	RAI1	Retinoic acid-induced protein 1	Transcriptional regulator , embryonic and postnatal development
P84098	RPL19	Large ribosomal subunit protein eL19	Component of the large ribosomal subunit
P52565	ARHGDI8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Controls Rho proteins homeostasis, Regulates the GDP/GTP exchange reaction
O75955	FLOT1	Flotillin-1	Scaffolding protein within caveolar membranes
P54819	AK2	Adenylate kinase 2, mitochondrial	Catalyzes the reversible transfer of the terminal phosphate group between ATP and AMP
Q9NWZ3	IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Initiating innate immune response

Q01650	SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	Amino acid exchanger
O75436	VPS26A	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	Component of the retromer cargo-selective complex (CSC)
Q8NFV4	ABHD11	sn-1-specific diacylglycerol lipase ABHD11	Catalyzes the hydrolysis of diacylglycerol in vitro and may function as a key regulator in lipid metabolism
Q9BVK6	TMED9	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	Vesicular protein trafficking, mainly in the early secretory pathway
Q9BRK5	SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Regulate calcium-dependent activities in the endoplasmic reticulum lumen or post-ER compartment
P49792	RANBP2	E3 SUMO-protein ligase RanBP2	E3 SUMO-protein ligase which facilitates SUMO1 and SUMO2 conjugation by UBE2
Q6NUJ1	PSAPL1	Proactivator polypeptide-like 1	Activate the lysosomal degradation of sphingolipids
Q6E0U4	DMKN	Dermokine	Soluble regulator of keratinocyte differentiation
Q9BRQ8	AIFM2	Ferroptosis suppressor protein 1	Key inhibitor of ferroptosis
P30086	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Binds ATP, opioids and phosphatidylethanolamine
Q5JXB2	UBE2NL	Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	Protein polyubiquitination
Q13247	SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6	Constitutive splicing and modulates the selection of alternative splice sites
P49189	ALDH9A1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	Catalyze the irreversible oxidation of a broad range of aldehydes to the corresponding acids in an NAD-dependent reaction
Q96RS6	NUDCD1	NudC domain-containing protein 1	Eliciting a humoral response in individuals with a variety of solid tumors.
Q5JRA6	MIA3	Transport and Golgi organization protein 1 homolog	Plays a role in the transport of cargos that are too large to fit into COPII-coated vesicles
P46087	NOP2	Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	Involved in ribosomal large subunit assembly
O75916	RGS9	Regulator of G-protein signaling 9	Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits
Q32P28	P3H1	Prolyl 3-hydroxylase 1	Basement membrane-associated chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG)
Q03113	GNA12	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	Modulators or transducers in various transmembrane signaling systems
Q86UP2	KTN1	Kinectin	Receptor for kinesin thus involved in kinesin-driven vesicle motility
P27144	AK4	Adenylate kinase 4, mitochondrial	Maintaining the homeostasis of cellular nucleotides

P43246	MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2	Component of the post-replicative DNA mismatch repair system (MMR)
Q14257	RCN2	Reticulocalbin-2	Binds calcium
Q99666	RGPD5; RGPD6	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6	NLS-bearing protein import into nucleus
Q9BUZ4	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Cell proliferation, migration, differentiation, DNA repair, platelet activation or apoptosis
Q99719	SEPTIN5	Septin-5	Filament-forming cytoskeletal GTPase
Q06033	ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	Carrier of hyaluronan in serum or as a binding protein between hyaluronan and other matrix protein
Q9UFF9	CNOT8	CCR4-NOT transcription complex subunit 8	Has 3'-5' poly(A) exoribonuclease activity for synthetic poly(A) RNA substrate
P62841	RPS15	Small ribosomal subunit protein uS19	Component of the small ribosomal subunit
Q68D06	SLFN13	Schlafen family member 13	Endoribonuclease that cleaves tRNAs and rRNAs
Q96BY6	DOCK10	Dedicator of cytokinesis protein 10	Guanine nucleotide-exchange factor (GEF) that activates CDC42 and RAC1 by exchanging bound GDP for free GTP
Q6NUK1	SLC25A24	Mitochondrial adenyl nucleotide antiporter SLC25A24	Electroneutral antiporter that mediates the transport of adenyl nucleotides through the inner mitochondrial membrane
O00139	KIF2A	Kinesin-like protein KIF2A	Has microtubule depolymerization activity. Required for normal progression through mitosis
Q9UJ70	NAGK	N-acetyl-D-glucosamine kinase	Converts endogenous N-acetylglucosamine (GlcNAc) into GlcNAc 6-phosphate
Q13619	CUL4A	Cullin-4A	Core component of multiple cullin-RING-based E3 ubiquitin-protein ligase complexes which mediate the ubiquitination of target proteins
Q96DA2	RAB39B	Ras-related protein Rab-39B	Small GTPases Rab involved in autophagy
Q96CM8	ACSF2	Medium-chain acyl-CoA ligase ACSF2, mitochondrial	Acyl-CoA synthases catalyze the initial reaction in fatty acid metabolism, by forming a thioester with CoA
Q86UE8	TLK2	Serine/threonine-protein kinase tousel-like 2	Chromatin assembly and probably also DNA replication, transcription, repair, and chromosome segregation
Q96T23	RSF1	Remodeling and spacing factor 1	Regulatory subunit of the ATP-dependent RSF-1 and RSF-5 ISWI chromatin-remodeling complexes
O95810	CAVIN2	Caveolae-associated protein 2	Caveolar biogenesis and morphology
Q5JPF3	ANKRD36C	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	Ion channel inhibitor activity
Q9NVJ2	ARL8B	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	Small GTPase which cycles between active GTP-bound and inactive GDP-bound states

P51570	GALK1	Galactokinase	Catalyzes the transfer of a phosphate from ATP to alpha-D-galactose and participates in the first committed step in the catabolism of galactose
Q15751	HERC1	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1	Membrane trafficking via some guanine nucleotide exchange factor (GEF) activity and its ability to bind clathrin
Q9Y6M1	IGF2BP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	RNA-binding factor that recruits target transcripts to cytoplasmic protein-RNA complexes (mRNPs)
Q9C0C2	TNKS1BP1	182 kDa tankyrase-1-binding protein	Component of cytoskeleton
P10644	PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	Regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinases involved in cAMP signaling in cells
P30622	CLIP1	CAP-Gly domain-containing linker protein 1	Binds to the plus end of microtubules and regulates the dynamics of the microtubule cytoskeleton
P06737	PYGL	Glycogen phosphorylase, liver form	Allosteric enzyme that catalyzes the phosphorolytic cleavage of glycogen to produce glucose-1-phosphate, and plays a central role in maintaining cellular and organismal glucose homeostasis.
Q6WCQ1	MPRIP	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	Targets myosin phosphatase to the actin cytoskeleton
O14579	COPE	Coatomer subunit epsilon	binds to dilysine motifs and reversibly associates with Golgi non-clathrin-coated vesicles, which further mediate biosynthetic protein transport from the ER, via the Golgi up to the trans Golgi network
P46063	RECQL	ATP-dependent DNA helicase Q1	DNA helicase that plays a role in DNA damage repair and genome stability
P07686	HEXB	Beta-hexosaminidase subunit beta	Hydrolyzes the non-reducing end N-acetyl-D-hexosamine and/or sulfated N-acetyl-D-hexosamine of glycoconjugates
P09471	GNAO1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	Modulators or transducers in various transmembrane signaling systems
Q9NRV9	HEBP1	Heme-binding protein 1	Bind free porphyrinogens that may be present in the cell and thus facilitate removal of these potentially toxic compound
Q9BWD1	ACAT2	Acetyl-CoA acetyltransferase	Involved in the biosynthetic pathway of cholesterol
Q16799	RTN1	Reticulon-1	Inhibits amyloid precursor protein processing, probably by blocking BACE1 activity
P43897	TSFM	Elongation factor Ts, mitochondrial	Associates with the EF-Tu.GDP complex and induces the exchange of GDP to GTP

P31937	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial	Amino-acid degradation; L-valine degradation
Q9UHG3	PCYOX1	Prenylcysteine oxidase 1	Prenylcysteine oxidase that cleaves the thioether bond of prenyl-L-cysteines
P78417	GSTO1	Glutathione S-transferase omega-1	Exhibits glutathione-dependent thiol transferase and dehydroascorbate reductase activities
P07384	CAPN1	Calpain-1 catalytic subunit	Catalyzes limited proteolysis of substrates involved in cytoskeletal remodeling and signal transduction
O14874	BCKDK	Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase	Serine/threonine-protein kinase component of macronutrients metabolism
Q9UQ90	SPG7	Mitochondrial inner membrane m-AAA protease component paraplegin	Catalytic component of the m-AAA protease, a protease that plays a key role in proteostasis of inner mitochondrial membrane proteins, and which is essential for axonal and neuron development
Q93009	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Hydrolase that deubiquitinates target proteins



Review

LncRNAs and CircRNAs in Endoplasmic Reticulum Stress: A Promising Target for Cardiovascular Disease?

Francisco José Martínez-Amaro ¹, Carlos Garcia-Padilla ^{1,2} , Diego Franco ^{1,3} and Houria Daimi ^{1,4,5,*}

¹ Department of Experimental Biology, University of Jaen, 23071 Jaen, Spain; fmamaro@ujaen.es (F.J.M.-A.); cgpadill@ujaen.es (C.G.-P.); dfranco@ujaen.es (D.F.)

² Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Institute of Molecular Pathology Biomarkers, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

³ Medina Foundation, 18016 Granada, Spain

⁴ Laboratory of Human Genome and Multifactorial Diseases (LR12ES07), Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Monastir 5000, Tunisia

⁵ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Gabes, Gabes 6072, Tunisia

* Correspondence: hdaimi@ujaen.es; Tel.: +216-25-223-446

Abstract: The endoplasmic reticulum (ER) is a principal subcellular organelle responsible for protein quality control in the secretory pathway, preventing protein misfolding and aggregation. Failure of protein quality control in the ER triggers several molecular mechanisms such as ER-associated degradation (ERAD), the unfolded protein response (UPR) or reticulophagy, which are activated upon ER stress (ERS) to re-establish protein homeostasis by transcriptionally and translationally regulated complex signalling pathways. However, maintenance over time of ERS leads to apoptosis if such stress cannot be alleviated. The presence of abnormal protein aggregates results in loss of cardiomyocyte protein homeostasis, which in turn results in several cardiovascular diseases such as dilated cardiomyopathy (DCM) or myocardial infarction (MI). The influence of a non-coding genome in the maintenance of proper cardiomyocyte homeostasis has been widely proven. To date, the impact of microRNAs in molecular mechanisms orchestrating ER stress response has been widely described. However, the role of long noncoding RNAs (lncRNAs) and circular RNAs (circRNAs) is just beginning to be addressed given the potential role of these RNA classes as therapeutic molecules. Here, we provide a current state-of-the-art review of the roles of distinct lncRNAs and circRNAs in the modulation of ERS and UPR and their impact in cardiovascular diseases.

Keywords: non-coding RNAs; ER stress; UPR; ERAD; apoptosis; autophagy; cardiovascular diseases



Citation: Martínez-Amaro, F.J.; Garcia-Padilla, C.; Franco, D.; Daimi, H. LncRNAs and CircRNAs in Endoplasmic Reticulum Stress: A Promising Target for Cardiovascular Disease? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 9888. <https://doi.org/10.3390/ijms24129888>

Academic Editors: Nicole Wagner and Kay-Dietrich Wagner

Received: 17 May 2023

Revised: 5 June 2023

Accepted: 6 June 2023

Published: 8 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the largest, multifunctional, membrane-like, cellular organelle, composed of smooth and rough ER and forms an interconnected network of space [1]. ER exerts a pivotal role in three physiological cellular processes: (1) modulation of correct protein secretion, folding and translocation from ER lumen, (2) regulation of intracellular Ca²⁺ uptake, storage and signalling and (3) production of several membrane cellular lipids such as cholesterol, ceramides and/or glycerophospholipids [2,3].

A significant percentage of intracellular proteins are synthesised in ER lumen, wherein its oxidative environment facilitates the formation of disulphide bonds on proteins by different chaperones, foldases and cofactors. Generating disulphide bonds leads to proper secretory and transmembrane protein folding [4,5]. Alteration of ER protein folding capacity may cause an increased proportion of unfolded and misfolded proteins in ER lumen which triggers loss of ER homeostasis and proteostasis and generates a detrimental cellular environment [6–8]. Several molecular and biophysical mechanisms are triggered to reverse and restore ER homeostasis such as (1) ER-associated degradation (ERAD), which triggers the misfolded protein degradation from ER lumen; (2) Unfolded protein

response (UPR) involving the restoration of ER proteostasis by activation of three transduction signalling –IRE1, ATF6 and PERK branch-; and (3) Reticulophagy, the process of ER remodelling by autophagy of membranes and associated proteins (see reviews [9–14]). Pathophysiological factors occurring in cardiovascular diseases (CVDs) such as metabolic derangement, hypoxia, hypertrophy or inflammation require an increased protein expression, thus enhancing the disruption of the cellular proteostasis [15–21]. As a consequence of the increased requirement of protein synthesis, ER homeostasis is ruptured and different subpopulations of cardiac cells suffer an unfolded and misfolded protein accumulation, which in turn, induces ER stress [22–25]. Accumulation of deleterious proteins triggers ER stress signalling which exerts a bivalent role both beneficial and/or harmful in cardiovascular function [26–33]. Furthermore, ER homeostasis is closely associated with normal cardiovascular function, and ER stress is considered a cause and a consequence of an extensive variety of CVDs such as ischaemic heart disease, hypertension, heart failure and dilated cardiomyopathy [34–37]. Here, we address an exhaustive current state-of-the-art of the impact of ncRNA in ERS-related cardiovascular diseases focusing on the role of distinct lncRNAs and circRNAs, described to date, on the modulation of UPR signal and their function in cardiovascular disease progression.

2. ERS and UPR Signalling

Since ER is crucial for the correct functioning of the cell, there are ER stress response mechanisms that control the degradation of the unfolded or misfolded proteins aiming to maintain ER homeostasis. The core mechanism of control is the activation of unfolded protein response (UPR). The central function of UPR is the inhibition of protein synthesis and the increase in the folding capacity of the ER. UPR may be activated by three different signal transduction pathways, initiated by three proteins located in ER membrane: inositol requiring protein 1 (IRE1), protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6). In basal conditions, these molecules are bound to a chaperone named Bip (or GRP78) and remain attached to the ER membrane. However, when misfolded or unfolded proteins are accumulated, they dissociate and trigger three different signalling pathways induced by IRE1, PERK and ATF6 to resolve ER stress (Figure 1) [38,39].

IRE1 is the most conserved factor across evolution involved in the UPR pathway. IRE1 possess an endoribonuclease activity domain responsible for its molecular function and is represented by two isoforms, IRE1 α and IRE1 β . IRE1 is activated by auto-phosphorylation and homodimerisation under the loss of ER homeostasis. Activated IRE1 is delivered to ER membrane and recognises a consensus region in the X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA, inducing alternative splicing by cleavage of a 26-nucleotide intron. Such a cleavage results in a functional active protein XBP1 named, XBP1s. XBP1s exerts as a transcription factor triggering expression of several UPR target genes such as ERAD components, ER chaperones, ER-translocation and folding enzymes further reducing ER stress levels. However, maintenance of IRE1 α results in increased apoptosis. IRE1 α interacts with tumour necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and adaptor protein tumour necrosis factor (TNF) to form a complex [40]. This complex recruits mitogen-activated protein kinase (MAPK), apoptosis signal-regulating kinase (ASK), and caspase-12 in order to trigger apoptosis [41,42].

Like IRE1, activation of PERK occurs by autophosphorylation of its kinase domain. Activated PERK modulates phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (Eif2 α), which in turn, inhibits 80S ribosome assembly and thus protein synthesis, inducing a reduction in the ERS. Furthermore, Eif2 α enhances the translation of activating transcription factor 4 (Atf4) mRNA. Atf4 induces the transcription of growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (Gadd34) and c/EBP homologous protein (CHOP) resulting in the activation of several proapoptotic signalling. CHOP induces apoptosis by the induction of several caspases and proapoptotic factors. Curiously, Gadd34 regulates the dephosphorylation of Eif2 α when ER stress is solved, and it restores the normal protein translation. Dephosphorylation of Eif2 α is required to conduct prosurvival signalling.

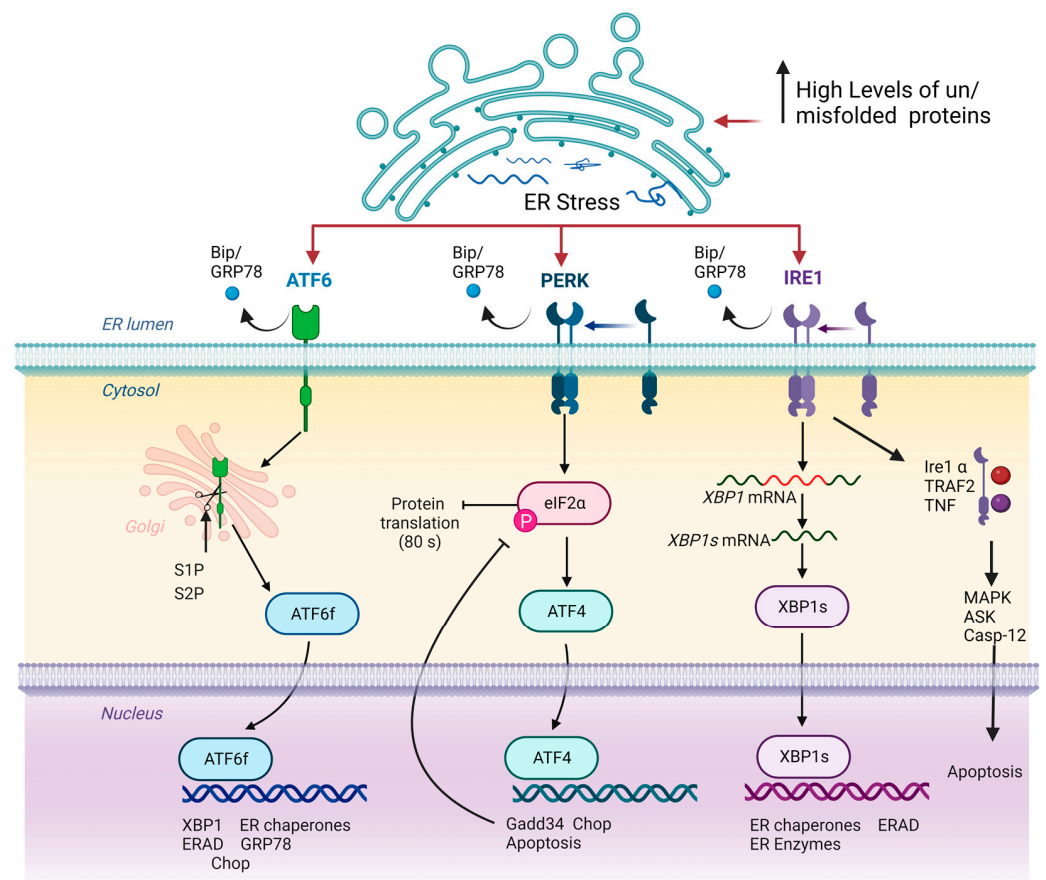


Figure 1. Schematic representation of UPR signalling pathways. Note that in homeostatic conditions, IRE1, ATF6 and PERK remain attached to ER membrane, exerting a sensorial cellular function. Loss of ER homeostasis by increased concentration of misfolded or unfolded proteins triggers the delivery of IRE1, ATF6 and PERK proteins to ER membrane by Bip/GRP78 factor. Subsequently, ATF6 is modified, acquiring transcriptional activity, while IRE1 and PERK activate ATF4 and XBP1s, respectively, which in turn exerts a transcriptional function. Inside the nucleus, ATF6, ATF4 and XBP1s initiate the expression of several genes that aim to restore cellular proteostasis. Arrows and bar-headed lines represent activation and inhibition effects respectively.

Activation transcription factor 6 (ATF6) is an ER transmembrane protein belonging to the leucine zipper transcription factor family. ATF6 acts as a core modulator of autophagy and apoptosis in response to increased ER stress [43]. When the ER is stressed, ATF6 is delivered from ER membrane by Bip and transported to the Golgi apparatus, where it is cleaved by two different proteases, site-1 protease (S1P) and site-2 protease (S2P), generating a 50 kDa amino-terminal cytoplasmic fragment and acquiring a transcriptional activation function (ATF6f). ATF6f is capable to enter the nucleus and trigger the expression of ERAD components, GRP78 and XBP1. Furthermore, ATF6 may bind to the endoplasmic reticulum response element (ERSE) and thereby activating CHOP and inducing cell apoptosis in several pathologies [44].

Early activation of UPR—named adaptive UPR—exerts a protective role against several injuries promoting cell survival and improving cellular function. Furthermore, UPR is required for different cellular processes such as differentiation and proliferation, pinpointing an important role in appropriate development and cellular physiology [45–48]. For example, activation of three branches of UPR- IRE1, PERK and ATF6- is necessary for the expression of several myogenic genes such as *Mef2c* or *MyoD*, the correct formation of myotubes and therefore proper embryonic myogenesis [49–52]. In addition, the regeneration of skeletal muscle by activation of satellite cells requires the expression of PERK signalling

and downstream genes suggesting a crucial role in the regenerative process [53]. Beneficial and physiological effects observed by adaptive UPR are closely related to the maintenance of calcium homeostasis, mitochondrial function and the regulation of homeostatic levels of free radicals in the cell cytoplasm [54–56]. However, prolonged stimulation of the UPR signalling pathway—known as maladaptive UPR—has a deleterious effect on cellular homeostasis increasing cellular apoptosis, ROS generation and impaired cell function thus displaying a detrimental role in several pathologies [57–61].

Complementary to the previously described mechanisms, there are also alternative processes that resolve ER stress and support UPR protective function such as ER-associated degradation (ERAD). ERAD is an evolutionarily and anciently conserved mechanism which modulates the degradation of misfolded or unfolded proteins from ER resulting in a subsequent reduction in the ERS. In this process, the misfolded or unfolded proteins accumulated in the ER are translocated to the cytosol where they are ubiquitinated and degraded by the proteasome.

ERAD substrates are recognised by different ligases and chaperones depending on whether the misfolded or unfolded domain of the protein is located in the ER lumen, within the ER membrane, or on the cytosolic side of the membrane (ERAD-L, ERAD-M and ERAD-C, respectively). ERAD-L and ERAD-M are driven by Hrd1—RING-finger ligase—a core ubiquitin ligase that forms a protein complex with other ligases such as Hrd3, Usa1 or Der1. Whereas ERAD-C substrates are targeted by Doa10p ligase.

Hrd1 protein is formed by six transmembrane domains and a cytoplasmic tail in which a catalytic RING finger is necessary for E3 ligase activity. Curiously, the transmembrane regions of Hrd1 may form a retrotranslocation channel to export ER proteins. The RING finger domain is located in the cytosol to serve at least two distinct purposes. First, Hrd1-dependent autoubiquitination of the RING finger domain gates its own channel function. This finding raises the possibility that deubiquitinases might counter the ubiquitination reaction and control the retrotranslocation event as well. Whether autoubiquitination is a general feature that regulates the channel activity of other E3 ubiquitin ligases dedicated to ERAD is unclear at this point. Second, Hrd1 catalyses ubiquitination of the misfolded substrates once exposed to the cytosol, which in turn are tagged for proteasomal degradation. Recently another E3 ligase gp78 has been described acting downstream, or in parallel, to the Hrd1-ligases complex, enhancing the solubility of the retrotranslocated protein substrates by proper proteasomal degradation.

Another important mechanism to resolve ER stress is reticulophagy, a type of macroautophagy leading to the removal of excess unfolded and misfolded proteins from ER lumen. This process consists of the creation of autophagosomes specifically from ER membranes in order to remove excess deleterious proteins of ER. Several molecular mechanisms of reticulophagy have been described [62–64]. Increased unfolded and misfolded proteins trigger auto-ubiquitination of the E3 ubiquitin-protein ligase tripartite motif-containing protein 13 (TRIM13) which recruits autophagy adaptor sequestosome 1 (p62). The oligomerisation of both proteins is dependent on the binding of N-Degron to the ZZ domain from p62. TRIM13-p62 protein complex oligomerisation is required to recruit LC3B and other chaperones involved in reticulophagy. LC3B induces specific reticulophagy of ER portions enriched in folding elements and chaperones involving lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP1), RAB7 (in ER- engulfing endolysosomes), charged multivesicular body protein 4B (CHMP4B) and vacuolar protein sorting-associated protein 4A (VPS4A) [45,65–68]. Furthermore, the PERK-EIF2A pathway is responsible for the activation of the ATG12-ATG16-ATG5 complex which in turn establishes a signature mark into autophagy membranes by converting LC3-I into LC3-II [69]. Like ERAD or UPRs, excessive removal of ER membranes could be translated into the disruption of autophagy and increased apoptosis [70,71].

3. Role of ERS and UPR in Cardiovascular Diseases

ERS and subsequent activation of UPR exhibit both beneficial and deleterious effects in cardiovascular diseases, being thus considered both as a cause and consequence of them. Cardiac pathologies increase the demand and requirements of the ER function since an enhanced proportion of misfolded proteins triggers in many cases the loss of homeostasis of this organelle. Furthermore, ERS exerts a pivotal role in the modulation of both Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial function in cardiomyocytes. Prola et al. (2019) have demonstrated that Tunicamycin (TM) treated cardiomyocytes display several changes in their cytoplasm ultrastructure, such as enlarged cytosol, decreased mitochondrial number, increased proportion of mitochondria-associated-membrane (MAM) fraction and expansion and dislocation of the ER near to nucleus and thus away from the sarcomeres. Accordingly, ERS reduced the mitochondrial number and function by downregulating several proteins involved in mitochondrial biogenesis such as PGC1a, TFAM, NRF1 or CS and thus is involved in the reduction of the mitochondrial capability to produce ATP [72]. Initially, adaptive UPR activation is capable of restoring ER and mitochondrial function and thus sustaining cardiac homeostasis. Curiously, the effects of molecular signalling pathways triggered by ERS are different within distinct cardiovascular injuries such as atherosclerosis, myocardial infarction, heart failure, cardiac hypertrophy or ischaemia and reperfusion (I/R) injury among others. For example, in heart failure or hypertrophy cardiac response caused by cardiac pressure overload, the PERK signalling pathway increases autophagy while it reduces ROS levels and apoptosis ratio by upregulation of EIF2A and ATF4, which in turn restores protein-folding capacity [31,73]. A sustained upregulation of the axis EIF2A-ATF4 will produce an increase in the cardiomyocyte apoptosis triggered by CHOP and these processes can influence the progression of cardiac diseases. In addition, PERK restores Ca^{2+} intracellular concentration by modulating Serca2a and Calreticulin, demonstrating its requirement for a proper ER-dependent ion homeostasis [74]. Unlike PERK, ATF6 is involved in the progression of cardiac hypertrophy and heart failure response thus exerting a harmful role. However, a protective role of ATF6 has been described in I/R injury suggesting a dependent and complex function of UPR based on the type of cardiac injury.

Effects of UPRs' downstream pathways have been elucidated using several murine models, which have highlighted the importance of ER stress and dependent molecular mechanisms in cardiac homeostasis and pathology (Figure 2). Curiously, ATF6 deficient mice display a worse cardiac function and recovery from infarction after (I/R) injury and increased damage with respect to controls [26]. Furthermore, ATF6 gain-of-function mice exhibits an alleviated myocardial infarction after I/R injury demonstrating that ATF6 is required to protect the heart from damage and injury caused by myocardial infarction [75]. Like ATF6, Xbp1s deficient mice display a worse recovery from heart failure showing an increased infarct size while in vivo overexpression of this gene is translated into reduced infarct size after I/R injury. Similar to that observed in ATF6 and Xbp1s overexpression mouse models, in vivo gain-of-function of Ire1 results in preserved cardiac function and reduced fibrosis after myocardial infarction [27,76]. Unlike IRE1 or ATF6, PERK deficiency has a beneficial phenotype after heart failure displaying protection against pressure overload myocardial infarction suggesting that while ATF6 and IRE1 exert a protective role against heart failure, PERK and its downstream pathways are detrimental [74]. Furthermore, PERK is a key gene involved in the transcription activation of CHOP, an essential factor to trigger ERS-associated apoptosis. CHOP-deficient mice are resistant to cardiac hypertrophy, increased fibrosis and cardiac dysfunction pinpointing the importance of apoptosis in deleterious processes related to cardiovascular diseases [77]. Furthermore, loss of function of enzymes related to ERAD signalling have been carried out, reflecting the importance of this mechanism in cardiovascular diseases. For example, Hrp1 deficient mice display an exacerbated cardiac dysfunction after myocardial infarction demonstrating that loss of one mechanism either UPR signalling or ERAD components is enough to impede recovery from cardiac injury [78].

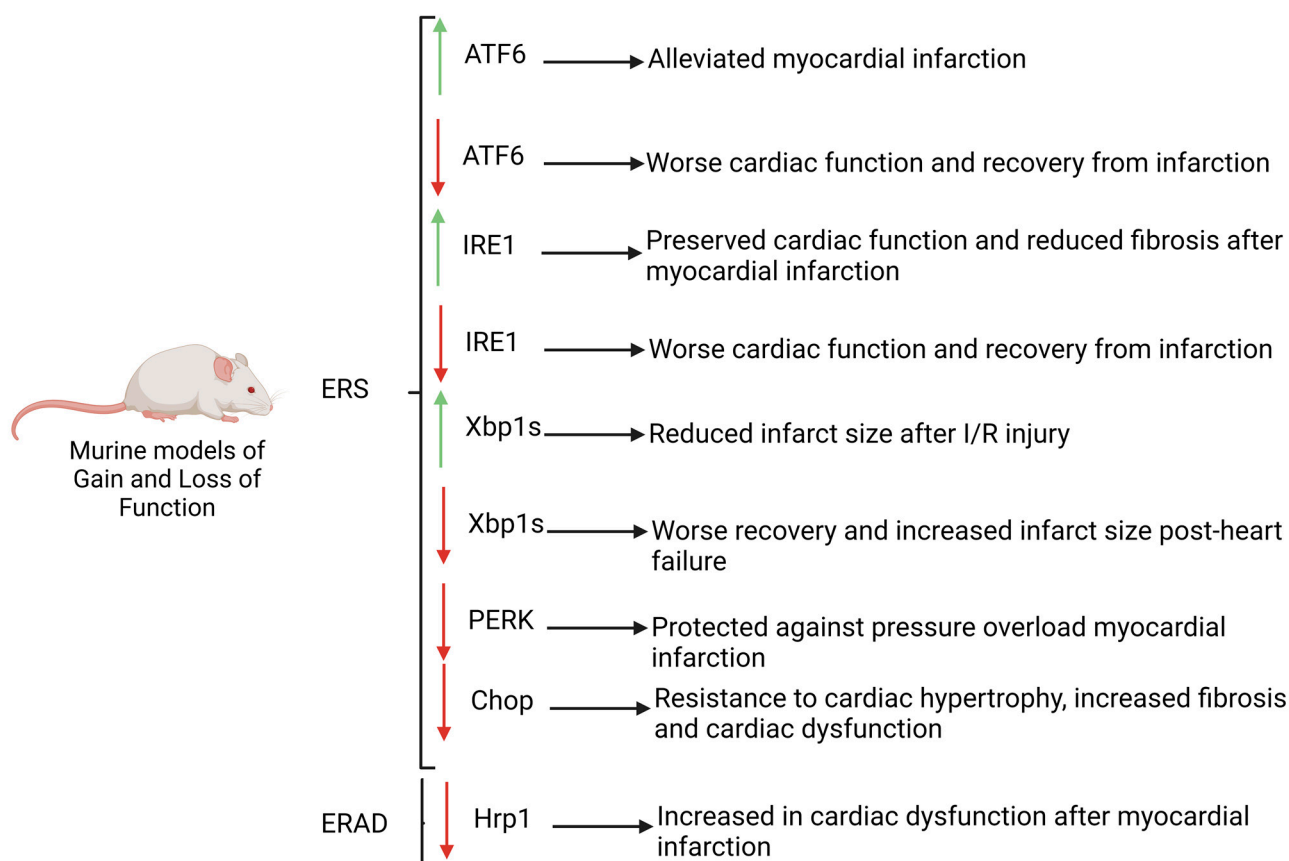


Figure 2. Murine models of gain and loss of function of key genes involved in UPR and ERAD pathways. Note that the deficiency of ATF6, IRE1, CHOP and HRP1 promotes the progression of CVDs, whereas low levels of PERK exert a protective role. Red arrows: downregulation, green arrows: upregulation.

Accordingly, different murine models have proved that the three main pathways involved in ER stress signalling—ATF6, IRE1 and PERK—may play crucial roles in the progression of cardiovascular diseases exerting either protective roles such as in the case of ATF6 or IRE1, or deleterious roles, in the case of PERK. In addition, cardiac dysfunction related to Hrp1 double knockout (dKO) mutant mouse pinpoints the importance of ERAD signalling in cardiac homeostasis.

4. Impact of LncRNAs and CircRNAs in ERS and UPR Response on Cardiovascular Diseases

Regulation of ERS and UPR response is the result of crosstalk between several molecular pathways, including therein transcriptional and/or post-transcriptional modulators. Over the last years, several authors have described a pivotal role of non-coding elements in the modulation of UPR signalling pathways, repressing or enhancing it in distinct cardiovascular diseases, particularly microRNAs. Although the role of microRNAs has been widely described [79–84], the impact of lncRNAs and circRNAs in ERS regulation and UPR in several cardiovascular diseases is just beginning to be addressed. To date, only seven lncRNAs and one circRNA have been described as pivotal modulators in cardiovascular diseases associated with increased ERS (Table 1). For example, in myocardial infarction (MI), two lncRNAs have been described to exert opposite actions in the progression of this disease namely MEG3—acting as a harmful regulator—and discrimination antagonising non-protein coding RNA (DANCR), which modulates a protective pathway against maladaptive UPR. In addition, an lncRNA—UCA1—and a circRNA—rcDLGAP4—have been described to play important roles in the regulation of the apoptosis induced by blood flow

restoration after MI. In the same way, in other cardiovascular pathologies such as atherosclerosis, cardiac hypertrophy, heart failure and dilated or diabetic cardiomyopathy, lncRNAs HypERlnc, NRB2, AC061961.2 and H19 exert different functions in the progression of these diseases.

Table 1. Overview of lncRNAs and circRNAs involved in ERS-associated CVDs.

ncRNA	CVD	Effects	Mechanisms	Subjects and Size	Study Model	Type of the Study	Ref.
HypERlnc	Atherosclerosis	Inhibition of maladaptive UPR	Decrease in mRNA/protein levels of ATF6, IRE1 α and Bip	Human cardiac tissue from patients with heart failure (HF) and pericytes exposed to hypoxia	Human	Gain and loss function assay <i>ex vivo</i> and <i>in vitro</i>	[85]
MEG3	Myocardial infarction	Activation of ERS-mediated apoptosis	Upregulation of mRNA/protein levels of GRP78, ATF4, PERK, eIF2 α , CHOP and caspase 3	Infarcted hearts and hypoxic neonatal mice ventricular myocytes	Mice	Lost function assay <i>in vitro</i>	[86]
DANCR	Myocardial infarction	Inhibition of ERS-mediated apoptosis	Repression of GRP78, Beclin 1, p-IRE1 α , p-IRE1 α /IRE1 α and Xbp1s by sponging miR-6324	H9C2 cardiomyocytes	Rat	Gain and loss function assay <i>in vitro</i>	[87]
UCA1	Ischaemia and reperfusion injury	Reduction of ROS production and improvement of mitochondrial function	Decrease in GRP78, ATF6 and PERK transcription	H9C2 cardiomyocytes	Rat	Gain and loss function assay <i>in vitro</i>	[88]
circDLGAP4	Ischaemia and reperfusion injury	Repression of ATF6 signalling pathway	Sponge to miR-143 avoiding to repression of HECTD1	Endothelial cells	Mouse	Gain function assay <i>in vitro</i>	[89]
NRB2	Heart hypertrophy and heart failure	Activation of LKB1/AMPK/Sirt1 pathway.	Decrease in mRNA/protein levels of PERK, IRE1, GRP78 and CHOP	Human cardiomyocytes cell line	Human	Gain-of-function assay <i>in vitro</i>	[90]
AC061961.2	Dilated cardiomyopathy	Reversion of apoptosis by activating Wnt/ β -catenin signalling	Decrease in mRNA/protein levels of GRP78, CHOP and caspase 3	<i>Vitro</i> and <i>in vivo</i> Adriamycin-induced DCM	Rat	Gain-of-function assay <i>in vitro</i>	[91]
H19	Diabetic cardiomyopathy	Repression of cardiomyocyte apoptosis	Decrease in mRNA/protein levels of ATF6, PERK, CHOP and IRE1 α	Induced DM mice	Mice	Gain function assay <i>in vitro</i>	[92]

Curiously, all of the previously described ncRNAs exert their effect as regulators of UPR response by either activating or repressing ATF6, PERK and IRE1 pathways at different levels but no lncRNAs or circRNAs have been reported related to reticulophagy or ERAD processes.

4.1. Atherosclerosis

Atherosclerosis is one of the main causes of cardiovascular diseases all over the world. It may be defined as the accumulation of fibrous materials and/or fatty acid in the deeper layer of the arteries, the intima layer, in addition to endothelial dysfunction and inflammation. This accumulation can produce a structure named atheroma or atheroma plaque whose growth can encroach the arterial lumen and hinder the blood flow [93]. Factors such as hyperlipidaemia, oxidative stress and calcium misbalance can alter ER homeostasis, and trigger ER stress. This state can induce atherosclerosis through different processes such as inflammation and apoptosis, among other factors [79]. The first report on the importance of lncRNAs in cardiovascular disease was provided by Bischoff et al. (2017) describing that HypERlnc, a previously unknown lncRNA annotated as ENSG00000262454, represents a pivotal repressor of UPR by promoting the inhibition of ATF6, IRE1 α and Bip transcriptional activation on pericytes exposed to hypoxia. Expression of HypERlnc was significantly downregulated in human cardiac tissue from patients with heart failure (HF). Furthermore, HypERlnc expression was significantly correlated with pericyte markers in human lungs derived from idiopathic pulmonary arterial hypertension patients. In addition, the loss of function of HypERlnc demonstrated that this lncRNA is essential for proper phenotype maintenance, proliferation and survival of pericytes [85]. However,

the molecular mechanisms underlying the Hyperlnc function have not been described (Figures 3A and 4).

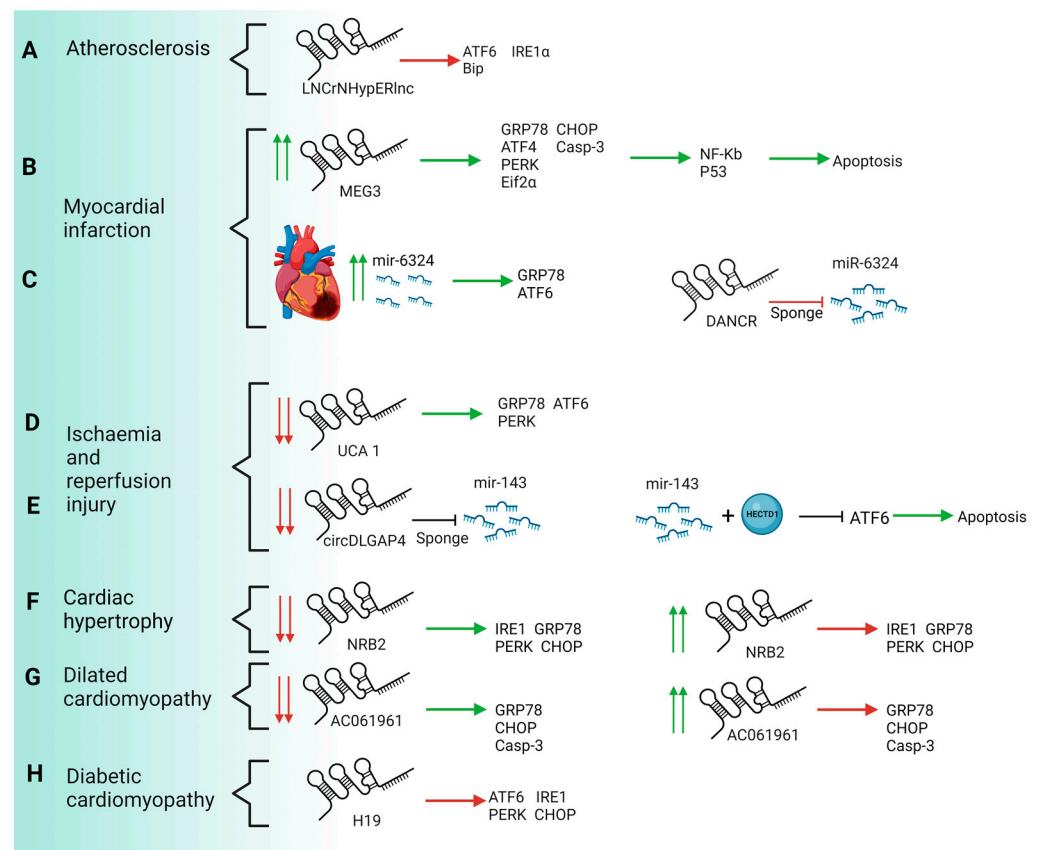


Figure 3. Schematic representation of molecular mechanisms of ncRNAs associated with CVDs. Note that while MEG3 (B) (and miR-62324 (C)) exerts a harmful role in ERS context, the rest of the lncRNAs currently reported are acting as protective molecules against ERS-mediated apoptosis. Hyperlnc, UCA1, NRB2 and AC061961 are downregulated in pathological conditions such as atherosclerosis (A), I/R injury (D), cardiac hypertrophy (F) and dilated cardiomyopathy (G), respectively. Particularly, upregulation of NRB2 and AC061961 in vitro results in downregulation of ERS markers such as PERK, IRE1, GRP78 and CHOP. In addition, H19 plays a protective role against diabetic cardiomyopathy by repressing ER stress (H). Downregulation of circDLGAP4 leads to reduced ERS through miR-143-HECTD1 mediated inhibition of ATF6 branch (E). Red arrows: downregulation, green arrows: upregulation.

4.2. Myocardial Infarction

Myocardial infarction is the main cause of disability or death in the world, may be a cause of instant death or decline of the heart capacity and it is usually preceded by atherosclerosis. Myocardial stroke results in cardiomyocyte cell death due to hypoxia or ischemia caused by an unbalance between the oxygen deposition and requirement in the heart. This ischemia may be caused by an occlusion of the coronary artery with consequent cell death and inflammation [94–96].

In 2019, Li et al. analysed the possible relation between lncRNA MEG3 and myocardial infarction pathology. Curiously, expression of MEG3 is increased in both infarcted hearts and hypoxic neonatal mice ventricular myocytes suggesting a possible role in MI. The same report showed that a decrease in MEG3 produces an improvement in cardiac function, a higher fractional shortening, ejection fraction and a lower left ventricular end-systolic and diastolic diameter. Like the MI model, hypoxic neonatal mice ventricular reduction of MEG3 expression alleviates cytotoxicity in the cells and improves cell viability [86].

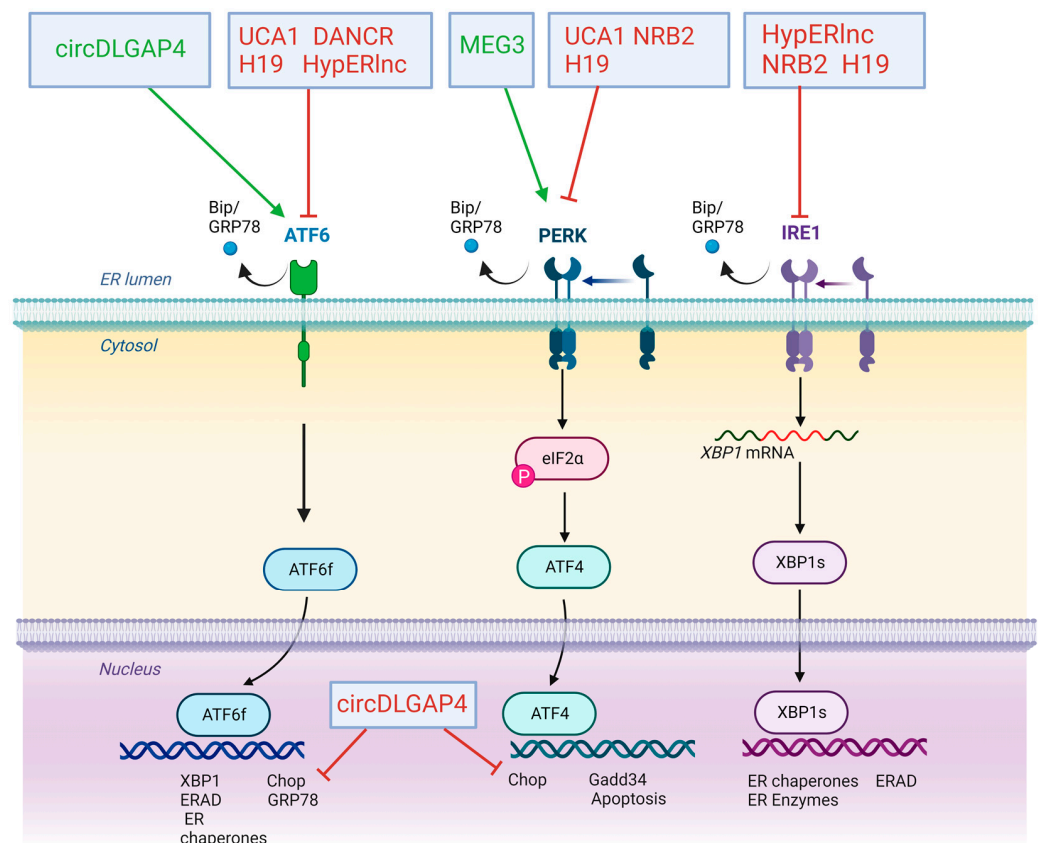


Figure 4. Schematic representation of ERS-associated lncRNAs and circRNAs role modulating UPR pathways in CVDs. Note that these lncRNAs and circRNAs play an inhibitor or enhancer role over the different molecules involved in the UPR pathway. Particularly, ATF6 pathway is enhanced by CircDLGAP4 and inhibited by UCA1, H19, HyperLinc and DANCR. Perk pathways are activated by MEG3 and inhibited by NRB2, H19 and UCA1. Finally, HyperLinc, H19 and NRB2 are reported to inhibit IRE1.

Mechanistically, knockout of MEG3 reverses apoptosis by repression of several ERS markers such as GRP78, ATF4, PERK, eIF2 α , CHOP and caspase 3. Transcriptional activation of genes involved in ERS-associated apoptosis is regulated by several transcription factors such as p53 or NF- κ B. MEG3 is capable of recognising p53, facilitating the binding of this transcription factor to genomic targets, and promoting the transcription of p53-dependent genes such as NF- κ B, which in turn enhances the expression of ERS-apoptosis genes. These results suggest that lncRNA MEG3 knockdown exerted cardioprotection by reducing ERS-mediated apoptosis through targeting p53 post-MI [86] (Figures 3B and 4).

Unlike MEG3, DANCR lncRNA exerts a protective role against cardiomyocyte apoptosis in MI. Interestingly, the expression of DANCR is downregulated by tunicamycin (TM) in a concentration-dependent manner, suggesting a possible function in ERS. TM treatment induces ERS-associated apoptosis by increasing expression levels of Bax, cleaved (c)-caspase-3/9, GRP78, IRE1 α , Xbp1s, ATF6, ATF4 and Beclin 1. Functional assays demonstrated that TM-treated H9C2 cells display a higher level of apoptosis and lower levels of cell viability, proliferation and autophagy. Curiously, overexpression of DANCR is capable of reversing the effects of TM treatment by reducing the expression of several ERS markers such as GRP78, and Beclin 1, while increasing the expression of apoptotic proteins Bcl-2. Furthermore, DANCR increases p-IRE1 α , p-IRE1 α /IRE1 α and Xbp1s and decreases Xbp1u expression levels, suggesting that DANCR selectively activates the IRE1 α pathway in the UPR, promoting autophagy and ERAD, and thus alleviating ERS. Mechanistically, DANCR acts as sponge lncRNA by recognising miR-6324, avoiding thus its

binding to mRNA targets. miR-6324 is upregulated in MI and exerts a deleterious role in the progression of this pathology. Additionally, the upregulation of miR-6324 is capable of reversing the protective role of DANCR by increasing cardiomyocyte apoptosis and inducing transcriptional activation of GRP78 or ATF6, thus suggesting an opposite role of ERS-induced TM treatment [63] (Figures 3C and 4).

Related to the progression of MI, an important consequence of the restoration of the blood flow is I/R injury, after a myocardial infarction it is necessary to salvage the ischemic region from stroke. Unfortunately, reperfusion itself is also a major contributor to the final tissue damage and cardiac apoptosis. Searching for drugs that prevent cell death and cardiac tissue damage is a milestone for cardiovascular medicine. In addition, the protective potential of several molecules of diverse nature, such as RNA or DNA-related drugs. Further, the gain and loss of function of several lncRNAs have been proved both in vivo and in vitro. As previously described above, myocardial I/R injury increases ERS and UPR response and leads to increased cell apoptosis, caused by enhanced production of reactive oxygen species (ROS), impaired calcium handling and mitochondrial dysfunction [97]. Chen et al. (2019) described the downregulation of lncRNA UCA1 in the I/R injury model of H9C2 cardiomyocytes. Loss of function assays demonstrated that repression of UCA1 results in the upregulation of pivotal factors involved in UPR signalling, such as GRP78, ATF6 and PERK but not IRE1 α . Enhanced expression of these factors reduced cell survival and increased intracellular levels of ROS. To address the possible role of UCA1 as a protective molecule against apoptosis, gain-of-function assays were performed showing that upregulation of UCA1 was capable of blocking ERS-associated apoptosis by repressing GRP78, ATF6 and PERK. In addition, overexpression of UCA1 reduces the production of ROS and improves mitochondrial function suggesting a potential role of this lncRNA as a possible protective factor in myocardial infarction and therefore heart failure. Regrettably, in vivo assays have not fully addressed yet the feasibility of UCA1 as a drug to improve cardiac recovery after HF [88] (Figures 3D and 4).

Under I/R injury, endothelial cells respond by increasing the production of inflammatory factors such as cytokines and chemokines, which in turn enhances the migration of these cells and generates a proapoptotic environment. Similarly to UCA1, circDLGAP4 displays reduced expression levels in the early phases of I/R recovery. Curiously, microRNA-143 exhibits an opposite expression pattern to circDLGAP4 during I/R injury displaying a peak expression in the advanced stages of injury. Functional assays showed that upregulation of circDLGAP4 results in decreased expression of ATF6 and migration of endothelial cells, but it does not modulate apoptosis signalling, suggesting that both processes are dependent on different molecular pathways. Mechanistically, circDLGAP4 exerts as a sponge of microRNA-143 impeding its binding to HECTD1, a pivotal ligase involved in the modulation of ERS on endothelial cells. HECTD1 reduces protein levels of ATF6 and its associated proapoptotic pathways. Furthermore, HECTD1 represses the migration of endothelial cells. Thus, the circDLGAP4-microRNA 143 complex increases the translation of HECTD1 protein which in turn leads to reduced ERS by blocking the ATF6 branch [89] (Figures 3E and 4).

4.3. Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

Heart hypertrophy requires cardiomyocyte growth resulting in increased protein synthesis in a short time span, generating a loss of ER homeostasis [98]. One of the core marks of heart hypertrophy and heart failure is metabolic derangement, which affects different genes involved in metabolic hypertrophy response such as 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (*Sirt1*), NAD-dependent deacetylase (*NADD*) or Liver kinase B1 (*LKB1*). Zhu et al. (2022) identified low plasma levels of NRB2 lncRNA in patients with left ventricular hypertrophy. Induced hypertrophy by Angiotensin II (Ang II) administration in human cardiomyocytes revealed the downregulation of NRB2 as well as an increased level of cardiac hypertrophy markers such as ANF or BMP10. Upregulation of NRB2 on cardiac human cell lines results

in severely reduced expression of cardiac hypertrophy markers and downregulation of ERS markers such as PERK, IRE1, GRP78 and CHOP. Moreover, the upregulation of NRB2 increases the expression of *LKB1*, *AMPK* and *Sirt1* suggesting that NRB2 may enhance the activation of the LKB1/AMPK/Sirt1 pathway. A loss of function assay of LKB1 was performed demonstrating that downregulation of LKB1 resulted in the weakened protective role of NRB2 on cardiac hypertrophy and ER stress. Taken together, NRB2 reduces myocardial hypertrophy by activating the LKB1/AMPK/Sirt1 pathway [90] (Figures 3F and 4).

4.4. Dilated Cardiomyopathy

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the main causes of heart failure exhibiting a prevalence of 7–10 million cases per year and approximately a 20% mortality rate. This cardiomyopathy is characterised by a progressive increase in ventricular size and contraction dysfunction of the left or both ventricles, without coronary artery diseases or changes in the pressure or load volume [99]. This affection appears in the third or fourth decade of life, displaying an incidence of 3:1 between man and woman suggesting a major prevalence in males as observed in other cardiovascular pathologies [100,101]. DCM hearts display an enhanced rate of cardiomyocyte apoptosis and intensive remodelling of the left ventricle which in turn can lead to heart failure. Several reports have pinpointed the crucial role of ERS in cardiomyocyte apoptosis associated with DCM. For example, Hamada et al. (2004) demonstrated that mutation of the Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) receptor in vivo results in the aggregation of misfolded proteins and increased cardiomyocyte apoptosis in mutant hearts by upregulation of CHOP. Curiously, transcriptional activation of CHOP is not exclusive to ATF6, IRE1 and PERK-related pathways [102]. Recently, Al-Yacoub et al. (2021) reported that a mutation in the *FBXO32* gene causes dilated cardiomyopathy by non-canonical activation of CHOP. Furthermore, heart explants from DCM patients exhibit increased expression of different ERS markers such as *ATF6*, *GRP78* or *XBP1* compared to controls demonstrating the activation of ERS and UPR pathways in DCM patients [30].

Transcriptome analysis of DCM hearts showed an intensive downregulation of AC061961.2, an unknown annotated lncRNA. Expression and functional analysis demonstrated that in vitro and in vivo Adriamycin-induced DCM reduces the expression of AC061961.2 while it enhances ERS-associated apoptosis by upregulating GRP78, CHOP, caspase 3 and Bax. Furthermore, Adriamycin treatment reduces protein levels of β -catenin, Axin-2 and c-Myc suggesting a downregulation of Wnt/ β -catenin signalling. Gain-of-function assays of AC061961.2 reverses Adriamycin-induced apoptosis by activating Wnt/ β -catenin signalling, increasing Bcl-2 expression and repressing protein levels of GRP78, CHOP and caspase 3 suggesting thus a role of AC061961.2 as a potential therapeutic drug against maladaptive UPR response [91] (Figures 3G and 4).

4.5. Diabetic Cardiomyopathy

Diabetic cardiomyopathy is characterised by myocardial fibrosis, ER stress induction and cardiomyocyte cell death with the consequent cardiac dysfunction. Recently, Wang et al. (2022) have described a protector role of H19 lncRNA in the progression of this sickness by repression of ER stress. In a gain-of-function assay with H19 lncRNA in mice, these authors showed a reduction in cardiac dysfunction and cardiac chamber dilatation related to minor deposition of interstitial collagen and fibrosis. These effects were explained by the effect of H19 lncRNA in the ERS and the subsequent apoptosis. H19 induces the downregulation of ERS markers, such as ATF6, PERK, CHOP and IRE1. These markers were upregulated in high glucose context and their presence induced UPR response and modified ER function. If the pathological stimulus persists, cardiac cells trigger an apoptotic program. The H19 effects previously detailed partially prevented cell death and the consequent alterations in heart function. Additionally, H19 alleviates ROS levels and indirectly reduces ROS-induced ERS [92]. Therefore, H19 exerts a key role in the progression of diabetic cardiomyopathy by the reduction of ERS and thus in the subsequent derived apoptosis (Figures 3H and 4).

4.6. Limitations and Unresolved Issues

Although the studies discussed above demonstrate a pivotal role of both lncRNAs and circRNAs in the modulation of ERS and UPR pathways and in the progression of the associated CVDs, several limitations and unresolved issues should be pointed out. Firstly, functional assays have been performed in vitro which urges the implementation of the in vivo assays before confirming the therapeutic potential of these molecules in the CVD context. Secondly, only functions of NRB2 and AC061961 have been evaluated in human cardiomyocytes. This said, the role of the rest of the ncRNAs described above should be examined in human cardiac models first in vitro in order to evaluate the functional conservation between species and identify similar action on ERS and UPR modulation. Third, more exhaustive studies have to be conducted to glimpse the specific molecular mechanisms by which the described lncRNAs and circRNAs positively or negatively modulate the adaptive and maladaptive ERS responses. Furthermore, it would be interesting to determine the role of these ncRNAs in the progression of the adaptive response (protective role of UPR) towards the maladaptive response (harmful role of UPR). Taken together, the current knowledge establishes an illuminating starting point to better understand the role of the non-coding genome in ERS modulation and associated cardiovascular diseases.

5. Future Perspectives and Conclusions

Over the last few years, the impact of the non-coding genome has been widely proven in all cellular processes such as specification, differentiation, proliferation or homeostasis. The dysregulation of non-coding RNAs involved in several molecular pathways has been described in a multitude of diseases such as tumorigenesis, immune system disorders, or neurodegenerative and cardiovascular diseases. Likewise, the function of different non-coding RNAs has been related to the proper function and morphology of different cellular organelles, i.e., ER, cytoskeleton or mitochondria. Broadly, ER exerts a pivotal role in cellular proteostasis modulating the correct protein folding. Increased requirement of protein synthesis by different cellular or pathological injuries may result in disturbing proteostasis, increasing ERS and therefore triggering cellular homeostasis loss. To solve it, cells account for several protective complex molecular mechanisms such as UPR, ERAD and reticulophagy, which restore cellular proteostasis.

Several reports have highlighted ERS as both cause and consequence of distinct cardiovascular pathologies such as myocardial infarction, dilated cardiomyopathy or atherosclerosis. The regulatory potential of non-coding RNAs in ERS pathways has just begun to be explored, demonstrating both a protective—repressing UPRs activators such as ATF6, IRE1 or PERK or downstream genes related to apoptosis such as *CHOP*—and a harmful role—increasing maladaptive UPR and associated gene function. Gain-of-function and/or loss of function of the lncRNAs and circRNAs described above result in dramatic activation or repression of ERS, and thus apoptosis, suggesting their potential role as therapeutic targets and pinpointing to the complex molecular regulation of ERS. Nevertheless, most studies depicting the role of these RNAs have been performed in vitro while in vivo approaches are still limited. Furthermore, it would be necessary to delve into the upstream signal pathways regulating the transcriptional process of these lncRNAs and circRNAs related to ERS in order to achieve a better knowledge about the molecular environment orchestrating ERS response in distinct cardiovascular diseases.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, F.J.M.-A. and C.G.-P.; writing—review and editing, D.F. and H.D.; visualization, D.F. and H.D.; supervision, D.F. and H.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from Junta de Andalucía CTS-446 and an international cooperation grant from AECID.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. English, A.R.; Zurek, N.; Voeltz, G.K. Peripheral ER Structure and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2009**, *21*, 596–602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Schwarz, D.S.; Blower, M.D. The Endoplasmic Reticulum: Structure, Function and Response to Cellular Signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *73*, 79–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Namba, T. Regulation of Endoplasmic Reticulum Functions. *Aging* **2015**, *7*, 901–902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Robinson, P.J.; Bulleid, N.J. Mechanisms of Disulfide Bond Formation in Nascent Polypeptides Entering the Secretory Pathway. *Cells* **2020**, *9*, 1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bulleid, N.J. Disulfide Bond Formation in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a013219. [[CrossRef](#)]
6. Braakman, I.; Bulleid, N.J. Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 71–99. [[CrossRef](#)]
7. Schubert, U.; Antón, L.C.; Gibbs, J.; Norbury, C.C.; Yewdell, J.W.; Bennink, J.R. Rapid Degradation of a Large Fraction of Newly Synthesized Proteins by Proteasomes. *Nature* **2000**, *404*, 770–774. [[CrossRef](#)]
8. Rao, R.V.; Bredesen, D.E. Misfolded Proteins, Endoplasmic Reticulum Stress and Neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 653–662. [[CrossRef](#)]
9. Gariballa, N.; Ali, B.R. Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation (ERAD) in the Pathology of Diseases Related to TGF β Signaling Pathway: Future Therapeutic Perspectives. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 575608. [[CrossRef](#)]
10. Reggiori, F.; Molinari, M. ER-Phagy: Mechanisms, Regulation, and Diseases Connected to the Lysosomal Clearance of the Endoplasmic Reticulum. *Physiol. Rev.* **2022**, *102*, 1393–1448. [[CrossRef](#)]
11. Bhardwaj, M.; Leli, N.M.; Koumenis, C.; Amaravadi, R.K. Regulation of Autophagy by Canonical and Non-Canonical ER Stress Responses. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *66*, 116–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lopata, A.; Kniss, A.; Löhr, F.; Rogov, V.V.; Dötsch, V. Ubiquitination in the ERAD Process. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ferro-Novick, S.; Reggiori, F.; Brodsky, J.L. ER-Phagy, ER Homeostasis, and ER Quality Control: Implications for Disease. *Trends Biochem. Sci.* **2021**, *46*, 630–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cherubini, A.; Zito, E. ER Stress as a Trigger of UPR and ER-Phagy in Cancer Growth and Spread. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 997235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Littlejohns, B.; Heesom, K.; Angelini, G.D.; Suleiman, M.S. The Effect of Disease on Human Cardiac Protein Expression Profiles in Paired Samples from Right and Left Ventricles. *Clin. Proteom.* **2014**, *11*, 34. [[CrossRef](#)]
16. Ridker, P.M. C-Reactive Protein, Inflammation, and Cardiovascular Disease: Clinical Update. *Texas Heart Inst. J.* **2005**, *32*, 384–386.
17. Wu, L.; Li, H.; Li, X.; Chen, Y.; Zhang, Q.; Cheng, Z.; Fan, Y.; Song, G.; Qian, L. Peptidomic Analysis of Cultured Cardiomyocytes Exposed to Acute Ischemic-Hypoxia. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *41*, 358–368. [[CrossRef](#)]
18. Vileigas, D.F.; Harman, V.M.; Freire, P.P.; Marciano, C.L.C.; Sant’Ana, P.G.; de Souza, S.L.B.; Mota, G.A.F.; da Silva, V.L.; Campos, D.H.S.; Padovani, C.R.; et al. Landscape of Heart Proteome Changes in a Diet-Induced Obesity Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18050. [[CrossRef](#)]
19. Mi, S.; Jiang, H.; Zhang, L.; Xie, Z.; Zhou, J.; Sun, A.; Jin, H.; Ge, J. Regulation of Cardiac-Specific Proteins Expression by Moderate-Intensity Aerobic Exercise Training in Mice With Myocardial Infarction Induced Heart Failure Using MS-Based Proteomics. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 1100. [[CrossRef](#)]
20. de Carvalho, A.E.T.S.; Cordeiro, M.A.; Rodrigues, L.S.; Ortolani, D.; Spadari, R.C. Stress-Induced Differential Gene Expression in Cardiac Tissue. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9129. [[CrossRef](#)]
21. Cauwenberghs, N.; Sabovčik, F.; Magnus, A.; Haddad, F.; Kuznetsova, T. Proteomic Profiling for Detection of Early-Stage Heart Failure in the Community. *ESC Heart Fail.* **2021**, *8*, 2928–2939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rasmussen, T.L.; Ma, Y.; Park, C.Y.; Harriss, J.; Pierce, S.A.; Dekker, J.D.; Valenzuela, N.; Srivastava, D.; Schwartz, R.J.; Stewart, M.D.; et al. Smyd1 Facilitates Heart Development by Antagonizing Oxidative and ER Stress Responses. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bozi, L.H.M.; Takano, A.P.C.; Campos, J.C.; Rolim, N.; Dourado, P.M.M.; Voltarelli, V.A.; Wisløff, U.; Ferreira, J.C.B.; Barreto-Chaves, M.L.M.; Brum, P.C. Endoplasmic Reticulum Stress Impairs Cardiomyocyte Contractility through JNK-Dependent Upregulation of BNIP3. *Int. J. Cardiol.* **2018**, *272*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Burgeiro, A.; Fonseca, A.C.; Espinoza, D.; Carvalho, L.; Lourenço, N.; Antunes, M.; Carvalho, E. Proteostasis in Epicardial versus Subcutaneous Adipose Tissue in Heart Failure Subjects with and without Diabetes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864 Pt A*, 2183–2198. [[CrossRef](#)]
25. Shimizu, T.; Maruyama, K.; Kawamura, T.; Urade, Y.; Wada, Y. PERK Participates in Cardiac Valve Development via Fatty Acid Oxidation and Endocardial-Mesenchymal Transformation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20094. [[CrossRef](#)]

26. Blackwood, E.A.; Azizi, K.; Thuerauf, D.J.; Paxman, R.J.; Plate, L.; Kelly, J.W.; Wiseman, R.L.; Glembotski, C.C. Pharmacologic ATF6 Activation Confers Global Protection in Widespread Disease Models by Reprogramming Cellular Proteostasis. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 187. [[CrossRef](#)]
27. Steiger, D.; Yokota, T.; Li, J.; Ren, S.; Minamisawa, S.; Wang, Y. The Serine/Threonine-Protein Kinase/Endoribonuclease IRE1 α Protects the Heart against Pressure Overload-Induced Heart Failure. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 9652–9661. [[CrossRef](#)]
28. Shimizu, T.; Taguchi, A.; Higashijima, Y.; Takubo, N.; Kanki, Y.; Urade, Y.; Wada, Y. PERK-Mediated Suppression of MicroRNAs by Sildenafil Improves Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure. *iScience* **2020**, *23*, 101410. [[CrossRef](#)]
29. Glembotski, C.C.; Arrieta, A.; Blackwood, E.A.; Stauffer, W.T. ATF6 as a Nodal Regulator of Proteostasis in the Heart. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 267. [[CrossRef](#)]
30. Al-Yacoub, N.; Colak, D.; Mahmoud, S.A.; Hammonds, M.; Muhammed, K.; Al-Harazi, O.; Assiri, A.M.; Al-Buraiki, J.; Al-Habeeb, W.; Poizat, C. Mutation in FBXO32 Causes Dilated Cardiomyopathy through Up-Regulation of ER-Stress Mediated Apoptosis. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 884. [[CrossRef](#)]
31. Yao, Y.; Lu, Q.; Hu, Z.; Yu, Y.; Chen, Q.; Wang, Q.K. A Non-Canonical Pathway Regulates ER Stress Signaling and Blocks ER Stress-Induced Apoptosis and Heart Failure. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Okada, K.I.; Minamino, T.; Tsukamoto, Y.; Liao, Y.; Tsukamoto, O.; Takashima, S.; Hirata, A.; Fujita, M.; Nagamachi, Y.; Nakatani, T.; et al. Prolonged Endoplasmic Reticulum Stress in Hypertrophic and Failing Heart after Aortic Constriction: Possible Contribution of Endoplasmic Reticulum Stress to Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circulation* **2004**, *110*, 705–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yamaguchi, O.; Higuchi, Y.; Hirotani, S.; Kashiwase, K.; Nakayama, H.; Hikoso, S.; Takeda, T.; Watanabe, T.; Asahi, M.; Taniike, M.; et al. Targeted Deletion of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 Attenuates Left Ventricular Remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 15883–15888. [[CrossRef](#)]
34. Zhou, Y.; Murugan, D.D.; Khan, H.; Huang, Y.; Cheang, W.S. Roles and Therapeutic Implications of Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wang, S.; Binder, P.; Fang, Q.; Wang, Z.; Xiao, W.; Liu, W.; Wang, X. Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart: Insights into Mechanisms and Drug Targets. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1293–1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Minamino, T.; Kitakaze, M. ER Stress in Cardiovascular Disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 1105–1110. [[CrossRef](#)]
37. Ren, J.; Bi, Y.; Sowers, J.R.; Hetz, C.; Zhang, Y. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Cardiovascular Diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* **2021**, *18*, 499–521. [[CrossRef](#)]
38. Chipurupalli, S.; Samavedam, U.; Robinson, N. Crosstalk Between ER Stress, Autophagy and Inflammation. *Front. Med.* **2021**, *8*, 758311. [[CrossRef](#)]
39. Lemmer, I.L.; Willemsen, N.; Hilal, N.; Bartelt, A. A Guide to Understanding Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Disorders. *Mol. Metab.* **2021**, *47*, 101169. [[CrossRef](#)]
40. Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; Ron, D. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science* **2000**, *287*, 664–666. [[CrossRef](#)]
41. Nakagawa, H.; Umemura, A.; Taniguchi, K.; Font-Burgada, J.; Dhar, D.; Ogata, H.; Zhong, Z.; Valasek, M.A.; Seki, E.; Hidalgo, J.; et al. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 331–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nishitoh, H.; Matsuzawa, A.; Tobiume, K.; Saegusa, K.; Takeda, K.; Inoue, K.; Hori, S.; Kakizuka, A.; Ichijo, H. ASK1 Is Essential for Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Cell Death Triggered by Expanded Polyglutamine Repeats. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 1345–1355. [[CrossRef](#)]
43. Hillary, R.F.; FitzGerald, U. A Lifetime of Stress: ATF6 in Development and Homeostasis. *J. Biomed. Sci.* **2018**, *25*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Park, S.-M.; Kang, T.-I.; So, J.-S. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* **2021**, *9*, 791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yang, H.; Ni, H.-M.; Guo, F.; Ding, Y.; Shi, Y.-H.; Lahiri, P.; Fröhlich, L.F.; Rüllicke, T.; Smole, C.; Schmidt, V.C.; et al. Sequestosome 1/P62 Protein Is Associated with Autophagic Removal of Excess Hepatic Endoplasmic Reticulum in Mice. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 18663–18674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Snyder, J.T.; Darko, C.; Sharma, R.B.; Alonso, L.C. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Proliferation Remains Intact in Aging Mouse β -Cells. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 734079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Legg, K. Defective UPR Linked to β -Cell Dedifferentiation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2022**, *18*, 716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Turishcheva, E.; Vildanova, M.; Onishchenko, G.; Smirnova, E. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Differentiation of Cells of Mesenchymal Origin. *Biochemistry* **2022**, *87*, 916–931. [[CrossRef](#)]
49. Nakanishi, K.; Sudo, T.; Morishima, N. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Transmitted by ATF6 Mediates Apoptosis during Muscle Development. *J. Cell Biol.* **2005**, *169*, 555–560. [[CrossRef](#)]
50. Gallot, Y.S.; Bohnert, K.R.; Straughn, A.R.; Xiong, G.; Hindi, S.M.; Kumar, A. PERK Regulates Skeletal Muscle Mass and Contractile Function in Adult Mice. *FASEB J.* **2019**, *33*, 1946–1962. [[CrossRef](#)]
51. Tokutake, Y.; Yamada, K.; Hayashi, S.; Arai, W.; Watanabe, T.; Yonekura, S. IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response Is Required during Early Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Roy, A.; Tomaz da Silva, M.; Bhat, R.; Bohnert, K.R.; Iwawaki, T.; Kumar, A. The IRE1/XBP1 Signaling Axis Promotes Skeletal Muscle Regeneration through a Cell Non-Autonomous Mechanism. *Elife* **2021**, *10*, e73215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Xiong, G.; Hindi, S.M.; Mann, A.K.; Gallot, Y.S.; Bohnert, K.R.; Cavener, D.R.; Whittmore, S.R.; Kumar, A. The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Regulates Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Regeneration. *Elife* **2017**, *6*, e22871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Mesbah Moosavi, Z.S.; Hood, D.A. The Unfolded Protein Response in Relation to Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle Cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2017**, *312*, C583–C594. [[CrossRef](#)]
55. Bhattarai, K.R.; Riaz, T.A.; Kim, H.-R.; Chae, H.-J. The Aftermath of the Interplay between the Endoplasmic Reticulum Stress Response and Redox Signaling. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 151–167. [[CrossRef](#)]
56. Daverkausen-Fischer, L.; Pröls, F. Regulation of Calcium Homeostasis and Flux between the Endoplasmic Reticulum and the Cytosol. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102061. [[CrossRef](#)]
57. Madden, E.; Logue, S.E.; Healy, S.J.; Manie, S.; Samali, A. The Role of the Unfolded Protein Response in Cancer Progression: From Oncogenesis to Chemoresistance. *Biol. Cell* **2019**, *111*, 1–17. [[CrossRef](#)]
58. Aghaei, M.; Dastghaib, S.; Aftabi, S.; Aghanoori, M.-R.; Alizadeh, J.; Mokarram, P.; Mehrbod, P.; Ashrafizadeh, M.; Zarrabi, A.; McAlinden, K.D.; et al. The ER Stress/UPR Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Life* **2020**, *11*, 1. [[CrossRef](#)]
59. Mokarram, P.; Albokashy, M.; Zarghooni, M.; Moosavi, M.A.; Sepehri, Z.; Chen, Q.M.; Hudecki, A.; Sargazi, A.; Alizadeh, J.; Moghadam, A.R.; et al. New Frontiers in the Treatment of Colorectal Cancer: Autophagy and the Unfolded Protein Response as Promising Targets. *Autophagy* **2017**, *13*, 781–819. [[CrossRef](#)]
60. Ajoolabady, A.; Lindholm, D.; Ren, J.; Pratico, D. ER Stress and UPR in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Pathogenesis, Treatments. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 706. [[CrossRef](#)]
61. Steinberger, A.E.; Tecos, M.E.; Phelps, H.M.; Rubin, D.C.; Davidson, N.O.; Guo, J.; Warner, B.W. A Novel Maladaptive Unfolded Protein Response as a Mechanism for Small Bowel Resection-Induced Liver Injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2022**, *323*, G165–G176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Kimura, T.; Jain, A.; Choi, S.W.; Mandell, M.A.; Schroder, K.; Johansen, T.; Deretic, V. TRIM-Mediated Precision Autophagy Targets Cytoplasmic Regulators of Innate Immunity. *J. Cell Biol.* **2015**, *210*, 973–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Li, J.; Xie, J.; Wang, Y.-Z.; Gan, Y.-R.; Wei, L.; Ding, G.-W.; Ding, Y.-H.; Xie, D.-X. Overexpression of LncRNA Dancr Inhibits Apoptosis and Enhances Autophagy to Protect Cardiomyocytes from Endoplasmic Reticulum Stress Injury via Sponging MicroRNA-6324. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *23*, 116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mochida, K.; Nakatogawa, H. ER-Phagy: Selective Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *EMBO Rep.* **2022**, *23*, e55192. [[CrossRef](#)]
65. Tschurtschenthaler, M.; Adolph, T.E.; Ashcroft, J.W.; Niederreiter, L.; Bharti, R.; Saveljeva, S.; Bhattacharyya, J.; Flak, M.B.; Shih, D.Q.; Fuhler, G.M.; et al. Defective ATG16L1-Mediated Removal of IRE1 α Drives Crohn's Disease-like Ileitis. *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 401–422. [[CrossRef](#)]
66. Ji, C.H.; Kim, H.Y.; Heo, A.J.; Lee, S.H.; Lee, M.J.; Kim, S.B.; Srinivasrao, G.; Mun, S.R.; Cha-Molstad, H.; Ciechanover, A.; et al. The N-Degron Pathway Mediates ER-Phagy. *Mol. Cell* **2019**, *75*, 1058–1072.e9. [[CrossRef](#)]
67. Kraft, C.; Deplazes, A.; Sohrmann, M.; Peter, M. Mature Ribosomes Are Selectively Degraded upon Starvation by an Autophagy Pathway Requiring the Ubp3p/Bre5p Ubiquitin Protease. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 602–610. [[CrossRef](#)]
68. Ossareh-Nazari, B.; Bonizec, M.; Cohen, M.; Dokudovskaya, S.; Delalande, F.; Schaeffer, C.; Van Dorsselaer, A.; Dargemont, C. Cdc48 and Ufd3, New Partners of the Ubiquitin Protease Ubp3, Are Required for Ribophagy. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 548–554. [[CrossRef](#)]
69. Zheng, W.; Xie, W.; Yin, D.; Luo, R.; Liu, M.; Guo, F. ATG5 and ATG7 Induced Autophagy Interplays with UPR via PERK Signaling. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 42. [[CrossRef](#)]
70. Liao, Y.; Duan, B.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Xia, B. Excessive ER-Phagy Mediated by the Autophagy Receptor FAM134B Results in ER Stress, the Unfolded Protein Response, and Cell Death in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 20009–20023. [[CrossRef](#)]
71. Li, S.; Li, H.; Yang, D.; Yu, X.; Irwin, D.M.; Niu, G.; Tan, H. Excessive Autophagy Activation and Increased Apoptosis Are Associated with Palmitic Acid-Induced Cardiomyocyte Insulin Resistance. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 2376893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Prola, A.; Nichtova, Z.; Pires Da Silva, J.; Piquereau, J.; Monceaux, K.; Guilbert, A.; Gressette, M.; Ventura-Clapier, R.; Garnier, A.; Zahradnik, I.; et al. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cardiac Dysfunction through Architectural Modifications and Alteration of Mitochondrial Function in Cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *115*, 328–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Nie, J.; Duan, Q.; He, M.; Li, X.; Wang, B.; Zhou, C.; Wu, L.; Wen, Z.; Chen, C.; Wang, D.W.; et al. Ranolazine Prevents Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Heart Failure by Restoring Aberrant Na(+) and Ca(2+) Handling. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 11587–11601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Liu, X.; Kwak, D.; Lu, Z.; Xu, X.; Fassett, J.; Wang, H.; Wei, Y.; Cavener, D.R.; Hu, X.; Hall, J.; et al. Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK) Protects against Pressure Overload-Induced Heart Failure and Lung Remodeling. *Hypertension* **2014**, *64*, 738–744. [[CrossRef](#)]

75. Jin, J.-K.; Blackwood, E.A.; Azizi, K.; Thuerlauf, D.J.; Fahem, A.G.; Hofmann, C.; Kaufman, R.J.; Doroudgar, S.; Glembotski, C.C. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 862–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wang, Z.V.; Deng, Y.; Gao, N.; Pedrozo, Z.; Li, D.L.; Morales, C.R.; Criollo, A.; Luo, X.; Tan, W.; Jiang, N.; et al. Spliced X-Box Binding Protein 1 Couples the Unfolded Protein Response to Hexosamine Biosynthetic Pathway. *Cell* **2014**, *156*, 1179–1192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Fu, H.Y.; Okada, K.; Liao, Y.; Tsukamoto, O.; Isomura, T.; Asai, M.; Sawada, T.; Okuda, K.; Asano, Y.; Sanada, S.; et al. Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload. *Circulation* **2010**, *122*, 361–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Doroudgar, S.; Völkers, M.; Thuerlauf, D.J.; Khan, M.; Mohsin, S.; Respress, J.L.; Wang, W.; Gude, N.; Müller, O.J.; Wehrens, X.H.T.; et al. Hrd1 and ER-Associated Protein Degradation, ERAD, Are Critical Elements of the Adaptive ER Stress Response in Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **2015**, *117*, 536–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Yang, S.; Wu, M.; Li, X.; Zhao, R.; Zhao, Y.; Liu, L.; Wang, S. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Atherosclerosis and Its Potential as a Therapeutic Target. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 9270107. [[CrossRef](#)]
80. Hu, J.; Huang, C.-X.; Rao, P.-P.; Cao, G.-Q.; Zhang, Y.; Zhou, J.-P.; Zhu, L.-Y.; Liu, M.-X.; Zhang, G.-G. MicroRNA-155 Inhibition Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Cardiomyocyte Apoptosis Following Myocardial Infarction via Reducing Macrophage Inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *857*, 172449. [[CrossRef](#)]
81. Toro, R.; Pérez-Serra, A.; Mangas, A.; Campuzano, O.; Sarquella-Brugada, G.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos, M.; Alcalá, M.; Carrera, E.; García-Padilla, C.; et al. MiR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Alonso-Villa, E.; Bonet, F.; Hernandez-Torres, F.; Campuzano, Ó.; Sarquella-Brugada, G.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos, M.; Mangas, A.; Toro, R. The Role of MicroRNAs in Dilated Cardiomyopathy: New Insights for an Old Entity. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Demirel-Yalciner, T.; Sozen, E.; Ozer, N.K. Endoplasmic Reticulum Stress and MiRNA Impairment in Aging and Age-Related Diseases. *Front. Aging* **2021**, *2*, 790702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhao, L.; Jiang, S.; Wu, N.; Shi, E.; Yang, L.; Li, Q. MiR-17-5p-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Promotes Acute Myocardial Ischemia Injury through Targeting Tsg101. *Cell Stress Chaperones* **2021**, *26*, 77–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Bischoff, F.C.; Werner, A.; John, D.; Boeckel, J.-N.; Melissari, M.-T.; Grote, P.; Glaser, S.F.; Demolli, S.; Uchida, S.; Michalik, K.M.; et al. Identification and Functional Characterization of Hypoxia-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Regulating LncRNA (HypERlnc) in Pericytes. *Circ. Res.* **2017**, *121*, 368–375. [[CrossRef](#)]
86. Li, X.; Zhao, J.; Geng, J.; Chen, F.; Wei, Z.; Liu, C.; Zhang, X.; Li, Q.; Zhang, J.; Gao, L.; et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Knockdown Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis by Targeting P53 Following Myocardial Infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 8369–8380. [[CrossRef](#)]
87. Li, W.; He, P.; Huang, Y.; Li, Y.-F.; Lu, J.; Li, M.; Kurihara, H.; Luo, Z.; Meng, T.; Onishi, M.; et al. Selective Autophagy of Intracellular Organelles: Recent Research Advances. *Theranostics* **2021**, *11*, 222–256. [[CrossRef](#)]
88. Chen, J.; Hu, Q.; Zhang, B.-F.; Liu, X.-P.; Yang, S.; Jiang, H. Long Noncoding RNA UCA1 Inhibits Ischaemia/Reperfusion Injury Induced Cardiomyocytes Apoptosis via Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress. *Genes Genom.* **2019**, *41*, 803–810. [[CrossRef](#)]
89. Bai, Y.; Zhang, Y.; Han, B.; Yang, L.; Chen, X.; Huang, R.; Wu, F.; Chao, J.; Liu, P.; Hu, G.; 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. [[CrossRef](#)]
90. Zhu, C.; Wang, M.; Yu, X.; Shui, X.; Tang, L.; Chen, Z.; Xiong, Z. LncRNA NBR2 Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Hypertrophy through Repressing ER Stress via Activating LKB1/AMPK/Sirt1 Pathway. *Bioengineered* **2022**, *13*, 13667–13679. [[CrossRef](#)]
91. Qiu, Z.; Chen, W.; Liu, Y.; Jiang, B.; Yin, L.; Chen, X. LncRNA AC061961.2 Overexpression Inhibited Endoplasmic Reticulum Stress Induced Apoptosis in Dilated Cardiomyopathy Rats and Cardiomyocytes via Activating Wnt/ β -Catenin Pathway. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2021**, *41*, 494–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Wang, S.; Duan, J.; Liao, J.; Wang, Y.; Xiao, X.; Li, L.; Liu, Y.; Gu, H.; Yang, P.; Fu, D.; et al. LncRNA H19 Inhibits ER Stress Induced Apoptosis and Improves Diabetic Cardiomyopathy by Regulating PI3K/AKT/MTOR Axis. *Aging* **2022**, *14*, 6809–6828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Libby, P.; Buring, J.E.; Badimon, L.; Hansson, G.K.; Deanfield, J.; Bittencourt, M.S.; Tokgözoğlu, L.; Lewis, E.F. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Liao, Y.-H.; Xia, N.; Zhou, S.-F.; Tang, T.-T.; Yan, X.-X.; Lv, B.-J.; Nie, S.-F.; Wang, J.; Iwakura, Y.; Xiao, H.; et al. Interleukin-17A Contributes to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Regulating Cardiomyocyte Apoptosis and Neutrophil Infiltration. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2012**, *59*, 420–429. [[CrossRef](#)]
95. Bo, Z.; Huang, S.; Li, L.; Chen, L.; Chen, P.; Luo, X.; Shi, F.; Zhu, B.; Shen, L. EGR2 Is a Hub-Gene in Myocardial Infarction and Aggravates Inflammation and Apoptosis in Hypoxia-Induced Cardiomyocytes. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2022**, *22*, 373. [[CrossRef](#)]
96. Thygesen, K.; Alpert, J.S.; White, H.D.; Jaffe, A.S.; Apple, F.S.; Galvani, M.; Katus, H.A.; Newby, L.K.; Ravkilde, J.; Chaitman, B.; et al. Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* **2007**, *116*, 2634–2653. [[CrossRef](#)]

97. Zhu, H.; Zhou, H. Novel Insight into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenesis of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 5529810. [[CrossRef](#)]
98. Samak, M.; Fatullayev, J.; Sabashnikov, A.; Zeriouh, M.; Schmack, B.; Farag, M.; Popov, A.-F.; Dohmen, P.M.; Choi, Y.-H.; Wahlers, T.; et al. Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **2016**, *22*, 75–79. [[CrossRef](#)]
99. Qiu, G.; Ren, L.; Jiang, H.; Shi, X.; Cao, L. Dilated Cardiomyopathy-Related Stroke Mimicking Large-Artery Atherosclerosis-Related Stroke: Report of Two Cases. *Signa Vitae* **2021**, *17*, 150–156. [[CrossRef](#)]
100. Japp, A.G.; Gulati, A.; Cook, S.A.; Cowie, M.R.; Prasad, S.K. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *67*, 2996–3010. [[CrossRef](#)]
101. Merlo, M.; Cannatà, A.; Gobbo, M.; Stolfo, D.; Elliott, P.M.; Sinagra, G. Evolving Concepts in Dilated Cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* **2018**, *20*, 228–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Hamada, H.; Suzuki, M.; Yuasa, S.; Mimura, N.; Shinozuka, N.; Takada, Y.; Suzuki, M.; Nishino, T.; Nakaya, H.; Koseki, H.; et al. Dilated Cardiomyopathy Caused by Aberrant Endoplasmic Reticulum Quality Control in Mutant KDEL Receptor Transgenic Mice. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 8007–8017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Review

Post-Transcriptional Regulation of Molecular Determinants during Cardiogenesis

Estefania Lozano-Velasco ^{1,2}, Carlos Garcia-Padilla ^{1,3}, Maria del Mar Muñoz-Gallardo ¹, Francisco Jose Martinez-Amaro ¹, Sheila Caño-Carrillo ¹, Juan Manuel Castillo-Casas ¹, Cristina Sanchez-Fernandez ^{1,2}, Amelia E. Aranega ^{1,2} and Diego Franco ^{1,2,*}

- ¹ Cardiovascular Development Group, Department of Experimental Biology, University of Jaen, 23071 Jaen, Spain; evelasco@ujaen.es (E.L.-V.); cgp00013@red.ujaen.es (C.G.-P.); mmmg0012@red.ujaen.es (M.d.M.M.-G.); fmamaro@ujaen.es (F.J.M.-A.); scano@ujaen.es (S.C.-C.); jmc0028@red.ujaen.es (J.M.C.-C.); csfernan@ujaen.es (C.S.-F.); aaranega@ujaen.es (A.E.A.)
- ² Fundación Medina, 18007 Granada, Spain
- ³ Department of Anatomy, Embryology and Zoology, School of Medicine, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain
- * Correspondence: dfranco@ujaen.es



Citation: Lozano-Velasco, E.; Garcia-Padilla, C.; del Mar Muñoz-Gallardo, M.; Martinez-Amaro, F.J.; Caño-Carrillo, S.; Castillo-Casas, J.M.; Sanchez-Fernandez, C.; Aranega, A.E.; Franco, D. Post-Transcriptional Regulation of Molecular Determinants during Cardiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2839. <https://doi.org/10.3390/ijms23052839>

Academic Editors: Guido Iaccarino and Christian Jung

Received: 31 January 2022
Accepted: 26 February 2022
Published: 4 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Cardiovascular development is initiated soon after gastrulation as bilateral precardiac mesoderm is progressively symmetrically determined at both sides of the developing embryo. The precardiac mesoderm subsequently fused at the embryonic midline constituting an embryonic linear heart tube. As development progress, the embryonic heart displays the first sign of left-right asymmetric morphology by the invariably rightward looping of the initial heart tube and prospective embryonic ventricular and atrial chambers emerged. As cardiac development progresses, the atrial and ventricular chambers enlarged and distinct left and right compartments emerge as consequence of the formation of the interatrial and interventricular septa, respectively. The last steps of cardiac morphogenesis are represented by the completion of atrial and ventricular septation, resulting in the configuration of a double circuitry with distinct systemic and pulmonary chambers, each of them with distinct inlets and outlets connections. Over the last decade, our understanding of the contribution of multiple growth factor signaling cascades such as Tgf-beta, Bmp and Wnt signaling as well as of transcriptional regulators to cardiac morphogenesis have greatly enlarged. Recently, a novel layer of complexity has emerged with the discovery of non-coding RNAs, particularly microRNAs and lncRNAs. Herein, we provide a state-of-the-art review of the contribution of non-coding RNAs during cardiac development. microRNAs and lncRNAs have been reported to functional modulate all stages of cardiac morphogenesis, spanning from lateral plate mesoderm formation to outflow tract septation, by modulating major growth factor signaling pathways as well as those transcriptional regulators involved in cardiac development.

Keywords: cardiac development; transcriptional regulation; microRNAs; lncRNAs

1. Growth Factor Signalling in Cardiac Morphogenesis

Specification, differentiation and development of cardiac progenitors are subjected to intense paracrine regulation mediated by different growth factors, particularly bone morphogenetic proteins (Bmps), fibroblastic growth factors (Fgfs), transforming growth factors (Tfgs) and Wnt signaling [1–3]. Importantly, these growth factor signals also contribute to additional cardiac morphogenetic processes, such as proepicardial/epicardial development [4–9], endocardial cushion formation [10–16] and outflow tract remodeling [14,17–19]. In addition, several other signaling pathways are also required for discrete cardiovascular morphogenetic processes, such as Hippo pathway that is fundamental for cardiomyocyte proliferation and organ size determination [20–22], and Notch and neuregulin signaling

pathways [23–29] that are required for ventricular morphogenesis and maturation. Evidence of the functional role of non-coding RNAs impacting on these signaling pathways has been recently reported as detailed in the following subheadings.

2. Transcriptional Control of Cardiac Morphogenesis

Cardiac morphogenesis is orchestrated by a large number of transcriptional regulators. Precardiac mesoderm is configured by *Mesp1* and *Mesp2* expression [30–32]. Soon thereafter, the cardiogenic cells are characterized by the expression of cardiac enriched transcription factors such as *Gata4*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Srf* that start conferring the initial cardiomyocyte properties and providing positional clues to develop the initial cardiac straight tube [33–42]. Rightward bending is governed by a differential outgrowth regulated by *Prrx1* [43] while *Pitx2* imprints left-sided positional cues to the linear heart tube [44–48]. Subsequently, as cardiac chambers emerge, distinct members of the T-box family display regional expression, providing transcriptional cues for the formation of the arterial pole by *Tbx1* expression [49,50], the prospective atrioventricular canal and thus part of the slow components of the cardiac conduction system by expression of *Tbx2* and *Tbx3* [51,52], the left ventricle and atrial chambers by *Tbx5* [53–56] and the external epicardial lining by *Tbx18* [57,58]. In addition, systemic and pulmonary ventricles are characterized by *Hand1* and *Hand2* transcriptional inputs [59–62], while atrial and ventricular chambers are characterized by *Coup-TFII* [63], *Hey1* and *Hey2* expression [64,65], respectively. Thus, overall, an intricate transcriptional regulation governs cardiac morphogenesis, providing evidence of a complex and exquisite regulatory network that involves many transcription factors.

3. The Emergence of a Novel Layer of Gene Regulation: Post-Transcriptional Regulation by Non-Coding RNAs

Whereas transcriptional regulation constitutes a major step governing and defining the molecular mechanisms that direct cardiac morphogenesis and cardiovascular cell differentiation, a novel layer of gene regulation is emerging with the discovery of non-coding RNAs. Non-coding RNAs are broadly classified according to their length in two distinct categories, small non-coding RNA if smaller than 200 nucleotides and long non-coding RNAs if larger than 200 nucleotides [66,67]. Small non-coding RNAs are represented by distinct RNA types such as snoRNAs, siRNAs, piRNAs and the most extensively studied and abundantly expressed microRNAs [68,69]. In all cases, these small non-coding RNAs exerts their function as post-transcriptional regulators, as detailed below. On the other hand, long non-coding RNAs represent a wide and large array of non-coding RNAs that can be classified according to the genomic location (promoter associated, sense, antisense, bidirectional, intronic, intergenic, 3'UTR associated, 5'UTR associated lncRNAs) and/or their functional properties [70–72]. Importantly, lncRNAs can be located in distinct subcellular compartments [73,74], such as the nucleus and the cytoplasm, exerting distinct functional roles, i.e., at transcriptional and post-transcriptional, respectively.

4. Biogenesis and Function of microRNAs and lncRNAs

MicroRNAs represent the most studied subtype of small non-coding RNAs [69,70]. microRNAs display temporal and spatial differential expression in both embryonic and adult tissues, contributing thus to both embryonic development and tissue homeostasis [75]. Impaired expression and/or function of microRNAs also lead to pathological conditions [76,77]. Importantly, microRNAs are highly conserved during evolution, ranging from *C. elegans* to humans. MicroRNAs are encoded in the nucleus, by transcription of precursors microRNA molecules that are normally transcribed by RNA polymerase II. In certain genomic localization, microRNAs are clustered in such a way that the primary transcript contains multiple microRNA precursors, such as in the case of miR-23/miR-27/miR-24 cluster, a transcript thus named pri-miRNA. Pri-miRNA is then processed by RNAses such as *Drosha* and *Dgcr8* to generate distinct pre-miRNA molecules, i.e., pre-miR-23, pre-miR-27 and pre-miR-24, that are subsequently exported to the cytoplasm by

exportin-5/Ran protein complex. Within the cytoplasm, the pre-miRNA is processed into a mature microRNA duplex by Dicer RNase and loaded into the RISC complex in which one of the double-stranded microRNA molecule is degraded. The mature single-stranded microRNA molecule within the RISC complex is able now to scan other RNA molecules for sequence homology of its seed sequence provoking RNA target cleavage, translation repression and/or RNA deadenylation [78,79]. In most cases, the final output consequence is a decrease on the miRNA/protein target abundance.

Long non-coding RNAs also display tissue-specific expression during embryogenesis and tissue homeostasis, being their role in pathology also emerging [73,80,81]. However, their tissue expression levels are, on average, 10-fold lower than mRNAs and microRNAs and they are poorly conserved during evolution. LncRNAs are transcribed in the nucleus, in most cases by RNA polymerase II, and display genomic organization similar to coding RNAs, i.e., introns and exons which are processed by alternative splicing. LcnRNAs are, in most cases, 5' capped and 3' polyadenylated and are distinctly distributed in the nucleus or the cytoplasm or both subcellular compartments simultaneously [73,82]. Importantly, although their sequence length can, in some cases, exceed 10 Kb, the lncRNAs do not contain open reading frames or if they do, they only provide small oligopeptides or polypeptides that, in most cases, it is unclear if they are indeed translated and/or functional. At the functional level, lncRNAs can exert multiple tasks, such as modulation of transcription factor function, alternative splicing and histone modification (acetylation and/or methylation) at the transcriptional level. On the other hand at the post-transcriptional level, they can serve as scaffold for protein post-transcriptional modifications (phosphorylation, protein degradation), multimeric protein complex formation or as competing endogenous RNAs for microRNA sponging [73,80,81]. Furthermore, lncRNAs can also be processed to be loaded into extracellular vesicles, such as exosomes, and thus participate in intercellular communication processes [83,84].

5. Post-Transcriptional Control of Precardiac Mesoderm Formation by ncRNAs

Bmp signaling plays key determinant roles during cardiogenesis, particularly on the early stages of precardiac mesoderm specification [85–87]. Different murine mutant models for Bmp2, Bmp4 and Bmp7 have revealed the importance of these growth factors in cardiogenesis. For example, Bmp2 knock-out mice are embryonic lethal at E7.5 displaying an exocoelomic location of the heart and as well as cardiac differentiation defects [88–90]. Bmp4 deficient mice showed even an earlier embryonic lethality than Bmp2 null mutants [91]. Bmp4 induces the expression of Brachyury and Nanog, which in turn induces differentiation of the cardiogenic mesoderm while Bmp2 is necessary for the correct expression of two key factors for early cardiogenesis, Nkx2.5 and Gata4 [92,93]. In this context, it is important to highlight that miR-130 has been recently identified as a key molecular regulator of Bmp2-Fgf8 signaling during early cardiac specification. Bmp2 induces while Fgf8 represses, Nkx2.5 and Gata4 in early precardiac mesoderm. Bmp2 also induces miR-130 expression which directly targets Erk1/2 and thus influences Fgf8 expression [94] (Figure 1A,D).

The role of Wnt signaling in early cardiogenesis is still a matter of debate. Several reports pointed out that Wnt signaling is required for cardiac tissue formation emanating from the early mesoderm [95–97] while others reported that cardiac specification can occur independent of Wnt/beta-catenin signaling [98]. Overall, these data support the notion of a tight temporal and tissue specific role for Wnt signaling during early cardiogenesis [99,100]. Importantly, robust evidence on the role of Wnt signaling in cardiogenesis have been found during *in vitro* embryonic stem cell-derived cardiogenesis [101,102] and the implication of microRNA regulation in this setting has been documented.

factors. By over-expressing and inhibiting *let7c* expression in mouse embryonic stem cells, these authors demonstrate that cardiomyogenesis was promoted by mesodermal specification genes such as *T/Bra* and *nodal* as well as cardiac differentiation genes such as *Mesp1*, *Nkx2.5* and *Tbx5* were upregulated. Importantly, the functional role of *let-7c* is restricted to the early phase of mesoderm formation. *Let7c* induced upregulation of these transcription factors by directly targeting the Polycomb complex group protein *Ezh2* and thus modifying H3K27me3 marks from the promoters of crucial cardiac transcription factors. On the other hand, *miR-99a* represses cardiac differentiation via the nucleosome-remodeling factor *Smarca5*, attenuating the *Nodal/Smad2* signaling (Figure 1A,D).

Additional evidence of the functional role of microRNAs in the early stages of pre-cardiac mesoderm specification was reported by Chen et al. [111] since deletion of *Dgcr8* microprocessor, a key protein involved in microRNA biogenesis, in *Mesp1* cardiovascular progenitor cells lead to dilated cardiomyopathy, due to defective cardiomyocyte differentiation. These authors identified *miR-541* as a highly expressed microRNA in early mouse hearts (E9.5) that partly rescued the *Dgcr8* deletion *Mesp1* cardiovascular progenitor defects by downregulating angiogenic genes. Shen et al. [112] identified *miR-322/miR-503* as the most enriched microRNAs in *Mesp1* expressing cells. Ectopic expression of *miR-322/miR-503* mimicked the endogenous temporal expression of genes driving cardiomyocyte specification while inhibiting neural lineage development (Figure 1A,D).

The precardiac mesoderm commitment into the cardiogenic lineage is primarily directed by the combinatorial action of several transcription factors such as *Gata4*, *Mef2c* and *Nkx2.5*. At present limited information is available about the regulation of *Gata4* by microRNAs during early cardiogenesis. Yao et al. [113] described that *miR-200b* targets *GATA4*, modulating thus myosin heavy chain expression (Figure 1A,D). On the other hand, additional evidence is reported during cardiac hypertrophy as *Gata4* is modulated by *miR-26* [114] and during hypoxia by *miR-200* [115]. While there is scarce indirect evidence of microRNAs targeting *Nkx2.5* during early stages of cardiogenesis in mice [116], modulation of *miR-1* by *Nkx2.5* is essential for early cardiogenesis in *Drosophila* [117] (Figure 1A,D). Additional indirect evidence is also reported in mice, including therein *miR-1*, *miR133* and *miR-128b*, and demonstrating a key role for *miR-128b* in cardiogenesis [118]. However, it needs to be considered that some controversies are emanating in this context, as the cardiac miRnome of precardiac mesoderm and early committed cardiomyocytes is not significantly altered in absence of *Nkx2.5* [119]. As previously mentioned, Coppola et al. [110] reported that *let-7c* upregulated genes involved in mesoderm specification as well as cardiac differentiation markers such as *Mesp1*, *Nkx2.5* and *Tbx5*. Evidence of *Nkx2.5* regulation by these microRNAs, i.e., *miR-1* and *miR-133* is also reported in other biological contexts [120].

Finally, similarly scarce reports have demonstrated the regulation of *Mef2c* by microRNAs in the cardiovascular context. Chinchilla et al. [121] firstly reported that *miR-27b* directly targets *Mef2c*, while more recently Chen et al. [122] demonstrated that *miR-199* inhibition leads to cardiomyocyte differentiation by up-regulating *Mef2c* expression in embryonic stem cells (Figure 1A,D). On the other hand, additional evidence on *Mef2c* regulation by microRNAs has been reported during skeletal muscle development, such as *miR-449* [123], *miR-194* [124], *miR-204* [125], *miR-1* [126], *miR-206* [126] and *miR-214* [127], while *miR-488* regulates *Mef2c* in vascular smooth muscle cells [128].

LncRNAs are versatile RNA molecules that can modulate gene expression either at transcriptional or post-transcriptional level depending on their subcellular localization. To date, our understanding of the functional role of lncRNAs during early stages of heart development is still incipient. A fundamental role for *Braveheart* lncRNA has been reported during early precardiac mesoderm commitment. *Braveheart* is required for the activation of a core cardiovascular gene network by acting upstream of *Mesp1*. Mechanistically, *Braveheart* interacts with *SUZ12*, a component of polycomb-repressive complex 2 (PRC2), during cardiomyocyte differentiation [129] (Figure 1A,D). Importantly, *Braveheart* administration is sufficient for mesenchymal stem cells to differentiate into cardiogenic lineage in vitro [130]. Curiously, besides its early developmental role, *Braveheart* is also expressed

in the adult heart [131,132] and it is regulated by distinct core cardiac transcription factors [131]. Additional evidence on functional role of lncRNAs during early cardiomyogenic lineage specification has been obtained only using in vitro systems. For example, *uc.245* lncRNA over-expression downregulates the expression of several cardiomyogenic-specific molecular markers such as *Nkx2.5*, *Gata4*, *Mef2c* in P19 cells [132,133]. Similarly, *uc.167* overexpression inhibits proliferation while promoting apoptosis in P19 cells and regulates *Mef2c* expression [134]. However, the molecular mechanisms underlying such effects remains unexplored. Interestingly *OIP5-AS1* lncRNA interacts with *Mef2c* mRNA promoting myogenic gene expression in vitro using a skeletal muscle cell line [135] (Figure 1A,D).

Besides *Braveheart*, *Moshe* lncRNA, an antisense transcript located upstream of *Gata6* locus, has also been reported to fine-tune early heart development. *Moshe* knock-down during cardiogenesis leads to significant repression of *Nkx2.5* in cardiac progenitor stages. RNA immunoprecipitation assays demonstrate that *Moshe* activates *Nkx2.5* gene expression via direct binding to its promoter region [136] (Figure 1A,D).

Fendrr, a lncRNA located in the vicinity of *Foxf1* locus and with enhanced expression at the caudal end of the lateral plate mesoderm is essential for heart and body wall development [137]. *Fendrr* knock out mice are embryonic lethal at E12.5 and displayed hypoplasia of the ventricular chamber and interventricular septum. Mechanistically, *Mef2c*, *Gata6* and *Nkx2.5* are upregulated in embryonic hearts whereas *Gata6*, *Foxf1*, *Pitx2* and *Irx3* were also upregulated in the caudal end of the lateral plate mesoderm in this mutant (Figure 2D). Regulation of the expression of these transcription factors is mediated by histone modification at their promoters [138].

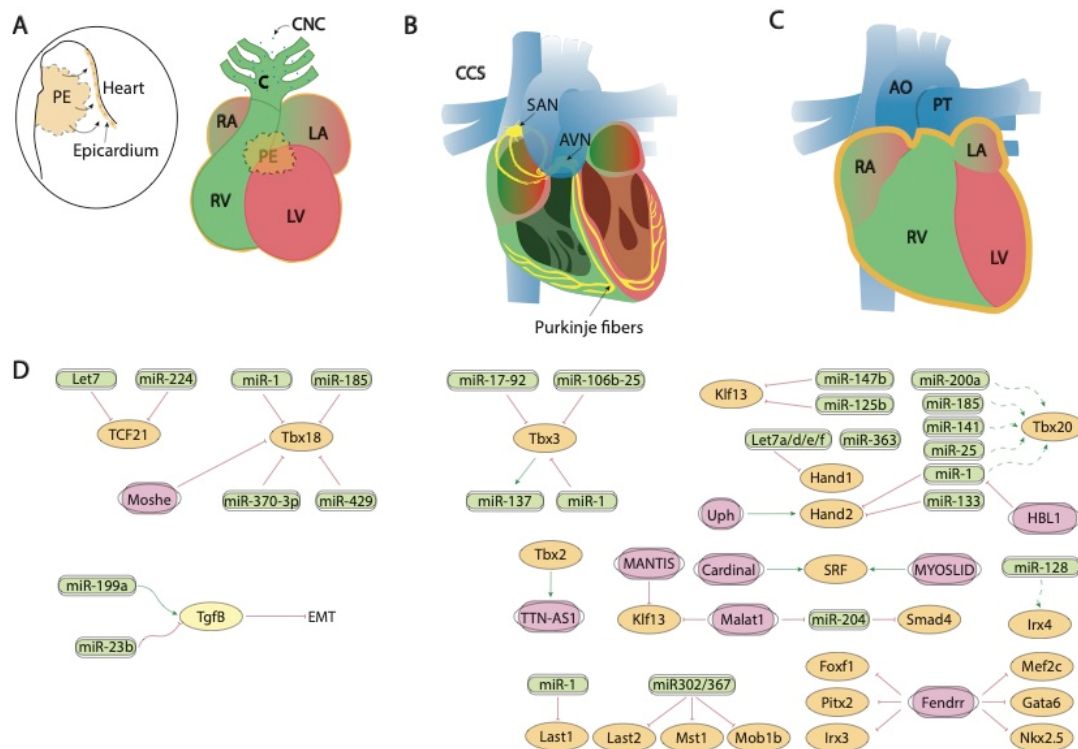


Figure 2. Schematic representation of the mid-developmental events during cardiovascular development, ranging from the epicardial lining of the developing heart and the arrival of the cardiac neural crest cells (A), the early configuration of the cardiac conduction system (B) and chamber septation process (C). (D) represent the current molecular interaction between microRNAs and lncRNAs with distinct growth factors and transcription factors involved in these developmental processes. PE, proepicardium, CNC, cardiac neural crest, CCS, cardiac conduction system, RA, right atrium, LA, left atrium, RV, right ventricle, LV, left ventricle, SAN, sinoatrial node, AVN, atrioventricular node, AO, aorta, PT, pulmonary trunk.

6. Post-Transcriptional Control of Heart Fields Deployment by ncRNAs

Several transcription factors have been identified as key regulators of second heart field deployment, among which the most relevant are Foxh1, Isl1 and Tbx5 as detailed below. Forkhead box protein family are important components of the signaling pathways that instruct cardiogenesis and embryonic heart development [138]. Particularly, Foxh1 acts as a mesodermal specification inductor during gastrulation and, as the development proceeds its expression is restricted to the developing heart [139–141]. In this way, Foxh1 modulates Mef2c and Pitx2 transcription factors during the anterior heart field (AHF) formation which is required for right ventricle (RV) and outflow tract (OFT) development during the heart looping stage [141]. Foxh1 systemic mutants are arrested at the cardiac linear heart tube stage [141]. In zebrafish model, it has been demonstrated that Foxh1 is a direct downstream target of let-7b and miR-103/107 microRNA family [142,143] (Figure 1A,D). In the first steps of development, miR-103/107 modulate Foxh1 expression which together with Smad3 are able to modulate Nodal expression in the lateral plate mesoderm. Impaired expression of this gene can disturb left-right signaling genes generating cardiac edema and kidney failure [143]. More recently, it has been demonstrated that Foxh1 represses miR-430, via non-canonical regulation during early development in zebrafish, balancing Nodal signaling which controls early zygotic gene expression [144] (Figure 1A,D). In other contexts, Foxh1 promotes breast cancer cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling pathway activation. In line with that, some authors conclude that let-7b may control cell cycle progression at least in part through the downregulation of Foxh1 [142,145].

Isl1 is a LIM-homeodomain transcription factor important for the development of multiple organs during embryogenesis. In particular, it has a crucial role during the secondary heart field (SHF) formation by directing the contribution of progenitor cells to the deployment of the right ventricle (RV), outflow tract (OFT) and the atria [146–148] during cardiovascular development.

Several microRNAs have been reported to modulate *Isl1* expression in this context. At the first steps of cardiac development, miR-128a modulates cardiac progenitor cells differentiation into different cardiomyocytes subpopulations through the modulation of Isl1 as well as such as Nkx2.5, Mef2c, Irx4 and Shox2 [118] (Figure 1A,D). However, whether such regulatory effects are direct or indirect remains to be established. It has also been demonstrated that BMP-signaling regulates the miR-17-92 cluster that modulate the molecular pathway which promotes SHF myocardial differentiation. Moreover, bioinformatics analyses have shown miR-17 and miR-20a seed sequences in the *Isl1* 3'UTR and those interactions were validated by luciferase assays (Figure 1A,D). These data reveal the mechanism underlying Bmp-regulated OFT myocardial differentiation and indicate that Bmp-regulated miRNA activity is critical for fine-tuning cardiac progenitor genes [149].

Regulation of *Isl1* by microRNAs has also been reported in distinct cardiac pathological conditions. In vitro experiments of cardiac hypertrophy stimulation with angiotensin II has evidenced that *Isl-1*⁺, *Sca-1*⁺, *c-kit*⁺ porcine cardiac progenitor cells exhibited high levels of Mef2c, Gata4, miR-29a and miR-21 [150]. Moreover, in another pathological context, such as type 2 diabetes mellitus, miR-128-3p targets *Isl1* promoting cardiovascular calcification and insulin resistance modulating Wnt pathway [151].

Tbx5 is a T-box transcription factor family member which has a key role during forelimb and cardiac development. The broad spatiotemporal expression of Tbx5 during development is generally conserved in vertebrates, for example, in human hearts. Tbx5 is expressed in the epicardium, myocardium, and endocardium of embryonic and adult hearts [152]. In zebrafish differential microRNAs and mRNAs expression were analyzed in Tbx5 deficient embryos, identifying miR-19a, miR-30, miR-34, miR-190 and miR-21 as differentially expressed microRNAs [153]. Importantly, some of these microRNAs are already known to be involved in cardiac development [154–157]. For example, miR-19a is essential for correct heart development [154], and, of particular importance is miR-34a, which has been previously described playing a protecting role against cardiac remodeling in a stress situation [155]. Furthermore, miR-30 modulates *Robo1*, which is implicated

in heart tube formation [156] and miR-21 could modulate *Ndr4* causing several cardiac defects [157].

Moreover, *Tbx5* and miR-218-1 have a correlated expression in mouse cardiomyocytes. In this line, it has been shown that, in zebrafish, *Tbx5* and miR-218-1 dysregulation affect early heart development, concretely, miR-218-1 modulation can rescue cardiac defects generated by *Tbx5* over expression, acting as a mediator of *Tbx5* during cardiogenesis [158]. In addition, *Tbx5* has been reported to be directly targeted by miR-200 [159] during cardiogenesis (Figure 1A,D).

Evidence on the regulatory role of lncRNAs modulating SHF transcription factors has been also reported in vitro by Hou et al. [130] demonstrating that *Braveheart* enhances *Isl1* expression as well as other cardiac enriched transcription factors such as *Nkx2.5*, *Gata4*, *Gata6* during the process of transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cells with the cardiogenic phenotype.

Importantly, *Moshe* knock-down also increases expression of SHF lineage genes such as *Isl1*, as well as several transcription factors relevant for subsequent morphogenetic processes such as *Hand2*, *Tbx2*, *Shox2* and *Tbx18*. Therefore, these data suggest that *Moshe* is a heart-enriched lncRNA that controls a sophisticated network of cardiogenesis by repressing genes in SHF via *Nkx2.5* during cardiac development [136] (Figure 1A,D).

Modulation of *Tbx5*, another SHF transcription factor has also been reported to be modulated by lncRNAs. *TBX5-AS1:2* lncRNA regulates *Tbx5* expression via modulation of its promoter methylation status. Curiously, *TBX5-AS1:2* lncRNA is dysregulated in Tetralogy of Fallot patients, suggesting a plausible role in the onset of this cardiac congenital defect [160]. Additionally, *Tbx5ua*, a lncRNA close to *Tbx5* locus is required for proper ventricular wall development, and thus being necessary for embryonic development, since *Tbx5ua* mouse knock-out embryonic lethal [161] (Figure 1A,D). Besides lncRNAs regulating *Tbx5*, evidence on the transcriptional regulation of *Tbx5* on non-coding RNAs has been recently elucidated by Yang et al. [162]. Over 2600 novel lncRNAs were identified as *Tbx5*-dependent lncRNAs and these authors further identified *RACER* as a novel lncRNAs that modulate the expression of the calcium-handling gene *Ryr2* (Figure 1A,D).

7. Post-Transcriptional Control of Sidedness and Cardiac Looping by ncRNAs

The establishment of sidedness and thus the configuration of left-right asymmetry is a complex developmental process in which multiple growth factors are involved, such as nodal, *lefty-1* and *lefty-2*, among others [163,164], that ultimately converge into the activation of *Pitx2* [165–168]. Importantly, *Pitx2* is dispensable for correct cardiac looping in mice [169,170] and recently *Prrx1* transcription factor has emerged as a key player in this developmental process [43].

Our current understanding of the functional role of microRNAs modulating left-right signaling is progressively emerging, yet most of the evidence has been obtained using in vitro models. Several lines of evidence demonstrated that *lefties* (*lefty-1* and *lefty-2*) are modulated by miR-302, miR-373 miR-430 and miR-427 in human embryonic stem cells (hESCs) [171–173] provoking alterations in early hESCs differentiation. Similarly, the role of miR-430 has been confirmed in zebrafish early development, by using target protectors [174], while miR-217 regulates *lefty-1* in mouse embryonic stem cells development, modulating thus mesendoderm formation [175]. In the Japanese flounder, squint is modulated by miR-430 [176] (Figure 1B–D).

Similarly, the role of microRNAs in Wnt signaling during cardiogenesis is limited [177] while increasing evidence has been reported in vitro [103–106], as previously stated. Importantly, in vivo evidence demonstrated that miR-19b overexpression in zebrafish embryos impaired left-right cardiac signaling leading to impaired cardiac development. Beta-catenin was identified as a direct miR-19b, supporting the notion of impaired Wnt signaling in this experimental model [177] (Figure 1B–D).

Pitx2 is a homeobox transcription factor which is expressed quite early in the embryo [167,178–181]. *Pitx2* expression is restricted to the left lateral plate mesoderm of

different species and several studies have demonstrated that *Pitx2* is important for transmitting positional information from LPM to organ primordia such as heart, lung and gut [182–184]. Moreover, during development and adulthood *Pitx2* expression remains in the developing heart, predisposing to atrial arrhythmias [167,185–187].

Our current understanding of the impact of microRNAs during embryonic *Pitx2* expression is still incipient. Wang et al. [185] demonstrated that *Pitx2* positively regulates miR-17-92 and miR-106b-25 repressing the sinoatrial node genetic program (Figure 1B–D). On the other hand, several studies have evidenced that *Pitx2* modulates the expression of several microRNAs that contribute to Atrial Fibrillation (AF), such as miR-106-25, miR-17-92, miR-29a, miR-200, miR-203, miR-21, miR-208ab, miR-1, miR-26b and miR-106ab [185,188–192]. The lack of *Pitx2* expression in the left atrial appendage impairs the expression of a microRNA battery (miR-21, miR-106a, miR-203 and miR-208ab down-regulated, and miR-1, miR-26b, miR-29a, miR-106b and miR-200 up-regulated) through a *Wnt8a* and *Wnt11* modulation, leading to a calcium, sodium and potassium channel remodeling during AF [185,188,189].

Prrx1 is a paired-like homeobox transcription factor that modulates EMT during embryonic development as well as in pathological conditions such as cancer [193]. During embryonic development, EMT is also regulated by other transcription factors such as *Snail*, *Zeb* and *Twist*. Fazilaty et al. [194] evidenced a feedback mechanism among these EMT inductive factors, regulated by microRNAs. Particularly, they reported that *Snail1* represses *Prrx1* whereas *Prrx1* represses *Snail1* via miR-15 regulation. Additionally, *Nodal* signaling in the left LPM downregulates *Prrx1* and *Snail1* via the upregulation of some microRNAs, such as *let7*, miR-34, miR-92, miR-124, miR-125, miR-135 and miR-184 [195]. It has been demonstrated that miR-34a and miR-92a modulate *Prrx1* expression in a narrow time window (Figure 1B–D). If these miRNAs are deregulated *Prrx1* expression is impaired, and consequently, a mesocardia is observed in embryos due to a loss of L/R asymmetry [195].

Regulation of *Pitx2* left-right transcription factor by lncRNAs has been reported in two distinct biological contexts. Within early developmental stages, it has been evidenced that the lncRNA *Pitx2* locus asymmetric regulated RNA (*Playrr*) and *Pitx2* displayed contralateral expression, in other words, while *Pitx2* has a left side pattern expression, *Playrr* is expressed in the right side of the embryo. Furthermore, there is a mutual antagonism between them that is regulated by chromosome structure. As *Pitx2* expression needs to be dynamic during development, *Pitx2* and *Playrr* interactions are tightly regulated to provide a proper *Pitx2* dose for gut development [196] (Figure 1B–D). However, no evidence is reported that such interaction also applies to cardiovascular development. In humans, lncRNA *Pitx2* adjacent noncoding RNA (PANCR) and *Pitx2* are co-expressed during cardiomyocyte differentiation and within human left atrium. However, functional role remains unclear, particularly in atrial fibrillation, a *Pitx2*-dependent arrhythmogenic defect [197] (Figure 1B–D).

8. Post-Transcriptional Control of Proepicardium/Epicardium Formation by ncRNAs

The proepicardium is a transitory structure that contributes to the developing heart by extruding cells into the external surface of the embryonic myocardium, lining it and subsequently experimenting an epithelial-to-mesenchymal transition that promotes these cells to contribute to distinct cardiovascular cell types, particular to the coronary vasculature and the cardiac fibroskeleton [198–201].

Tgf-beta signaling plays multiple roles during cardiogenesis, including epicardial development [202–210]. The role of microRNAs regulating epicardial development has been reported by Brønnum et al. [211], demonstrating enhanced miR-21 expression. In addition, Pontemazzo et al. [212] have shown selective miR-200c downregulation after Tgf-beta administration, influencing therefore the epithelial-to-mesenchymal transition of epicardial cells.

At transcriptional level, three distinct transcription factors have been reported to play essential roles in proepicardium and epicardium development, namely, *Tcf21*, *Tbx18* and

Wt1. Tcf21 is a transcription factor of the “helix-loop-helix” (HLH) family that is expressed in different tissues derived from the mesoderm, including therein the epicardium [213,214]. In the epicardium, one of the main functions of Tcf1 is to regulate the EMT and the subsequent differentiation and specification of cells derived from the epicardium (EPDC) towards different cell types [214]. The expression of Tcf21 in this tissue is regulated by various miRNAs, such as let-7 [215,216] or miR-224, which binds directly to the Tcf21 3'UTR [217] (Figure 2A,D). While the impact of Tcf21 regulation by microRNAs has not been reported to date during embryonic development, it is important to highlight that several examples of Tcf21-microRNA modulation has been reported in cardiac physiopathological conditions. In Caucasian and East Asian populations, an SNP (rs12190287) in the 3'UTR region of Tcf21 prevents miR-224 binding, resulting in impaired Tcf21 expression, a condition related to the development of alterations in the ventricular septum of the heart [218]. A deregulation of Tcf21 produced at this SNP has also been associated with the risk of coronary heart disease [219–221]. The lack of miR-224 binding generates inadequate cell differentiation because of alterations in activated proteins 1 (AP-1) and platelet-derived growth factor (PDGF) [222]. Furthermore, Tcf21 deregulation causes greater fibroblast development, since this factor acts as an antagonist in the MYOCD-SRF signaling pathway [223]. Another miRNA that regulates Tcf21 is miR-146a. In an Iranian population study, another SNP (rs2910164) is produced in the sequence of the precursor of miR-146a, altering the structure and expression of mature miRNA [224].

Tbx18 is involved in the development of the venous pole, the epicardial development and the development of cardiomyocytes of the interventricular septum [51]. Several miRNAs that regulate the expression of this transcription factor have been described, such as miR-1 and miR-185 in chicken [159] or miR-429 in humans [191]. miR-429 [225] and miR-370-3p [226] regulate the expression of Tbx18 during the development of the sinus node and thus the cardiac pacemaker action potential (Figure 2A,D).

Although it has been widely described that Wt1 is a key transcription factor for epicardial development ([227–230], non-coding RNAs that regulate the expression of Wt1 during cardiogenesis have not yet been identified.

At present, evidence of the regulation proepicardium/epicardium formation transcription factors by lncRNAs has only been reported for Tbx18, as previously mentioned by *Moshe* [136], while evidence for Tcf21 is lacking and for Wt1 has only been reported in other biological contexts [231–233] (Figure 2A,D).

9. Post-Transcriptional Control of Conduction System Development by ncRNAs

The cardiac conduction system constitutes the electrical wiring of the heart and it is originated from myocardial precursors sleeves located at the junction of the cardiac chambers [234]. Formation of the cardiac conduction system is highly dynamic during development and several transcription factors such as Tbx2, Tbx3, Irx3 and Irx5 have been reported to play fundamental roles during its configuration as detailed below.

Tbx3 is a cardiac transcription factor involved in the development of the sinoatrial node (SAN) and atrioventricular canal (AVC) [235,236]. Several miRNAs that regulate the expression of Tbx3 have been described, such as miR-17-92 and miR-106b-25, which are also regulated by Pitx2c on the left side. Pitx2c acts by positively regulating miR-17-92 and miR-106b-25 on the left side thus suppressing the development of the sinoatrial node, as both miRNAs negatively regulate Tbx3 expression. However, on the right side, there is no expression of Pitx2c, allowing the activation of the Shox2 signaling pathway and subsequently of Tbx3 [237]. Also important is the role played by miR-1 on Tbx3, controlling the differentiation of sinoatrial precursors (Figure 2B,D). In addition to confirming this by computer analysis [238], it was also experimentally demonstrated that the overexpression of miR-1 in mESC-derived cells produces a decrease in the expression of Tbx3, thus reducing the development of SAN [239]. Tbx3 is also involved in the pluripotency of embryonic stem cells [240]. miR-137 acts as a direct target of Tbx3 repressing its expression, since an overexpression of this miRNA produces a significant decrease in cell proliferation [241]

(Figure 2B,D). Tbx3 is able to modulate other factors that also intervene in the regulation of differentiation, such as Oct4, Sox2 or Nanog [242,243]. Such regulation is mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase-Akt and mitogen-activated protein kinase pathways, preferentially stimulating Nanog [244]. Therefore, although miR-137 does not have a direct target on Nanog, its expression can be regulated by the action of Tbx3 [241]. For Tbx2 and Irx3, non-coding RNAs that control the expression of Tbx2 and/or Irx3 during cardiogenesis have not been described at the moment, while scarce evidence is reported for Irx5 [245] in cardiac pathological conditions.

In line with the evidence reported during proepicardium formation, scarce evidence is currently available for the functional role of lncRNA regulating transcription factors with key relevant roles during conduction system formation. *TTN-AS1* is enriched during cardiac development and its expression is regulated by TBX2, suggesting a plausible role of *TTN-AS1* during cardiac conduction development [246] (Figure 2B,D).

10. Post-Transcriptional Control of Chamber Morphogenesis and Valve Development by ncRNAs

Soon after looping, distinct atrial and ventricular cardiac chambers are configured. Within the atrial chambers pectinated muscles are formed while within the ventricular chamber, the embryonic myocardium is initially configured into a trabecular meshwork that subsequently, as development proceeds is replaced by the progressive formation of a compact myocardial layer.

Several growth factors are implicated in different phases of cardiac chamber morphogenesis, in particular, Notch and Neuregulin play a fundamental role in establishing the trabeculated myocardium while Hippo signaling is essential for organ size.

Notch signaling is widely implicated in cardiogenesis, particularly establishing a cross-talk communication between myocardium and endocardium during chamber formation [247–249]. Despite the prominent role of Notch signaling during cardiogenesis, no evidence of microRNAs regulation has been reported directly targeting Notch1 in this context.

Neuregulin signal is essential for the correct ventricular chamber trabeculation [250–253]. To date, there is no evidence of microRNAs regulating neuregulin in the cardiovascular context, yet Sun et al. [254] identified several microRNAs that are modulated by neuregulin administration. Neuregulin administration in murine embryonic stem cells increased miR-296-3p and miR-200c while decreased miR-465b-5p expression. Importantly, manipulation of these microRNAs, i.e., inhibition of miR-296-3p or miR-200c decreased and inhibition of miR-465-5p, respectively, promoted differentiation of embryonic stem cells into the cardiac lineage (Figure 3A,C).

Hippo signaling is primarily involved during cardiac development by controlling cardiomyocyte proliferation and thus heart size [255,256] and also plays pivotal roles in cardiac regeneration [20,257] and diseases [258,259]. It has been reported that the miRNA cluster miR302–367 negatively regulates the Hippo pathway in vivo, by directly targeting three key components of this pathway, i.e., Last2, Mst1 and Mob1b thus promoting cardiomyocyte proliferation and dedifferentiation. More recently Xie et al. [259] demonstrated that miR-10b also regulated human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte proliferation via directly interacting with Last1, which is a major component of the Hippo pathway (Figure 2C,D).

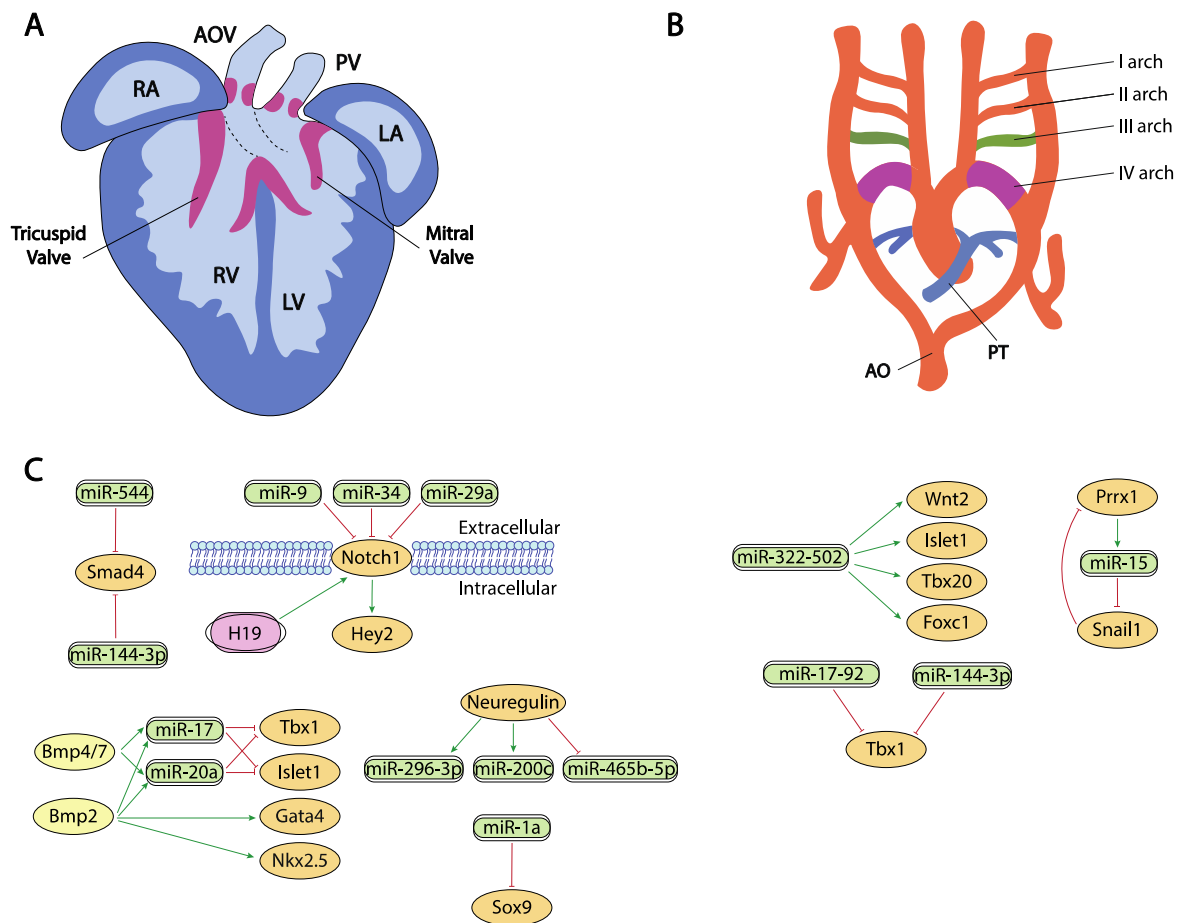


Figure 3. Schematic representation of the cardiac chamber and valvular morphogenesis (A) and the configuration and remodeling of the aortic arches (B). (C) represent the current molecular interaction between microRNAs and lncRNAs with distinct growth factors and transcription factors involved in these developmental processes. RA, right atrium, LA, left atrium, RV, right ventricle, LV, left ventricle, AO, aorta, PT, pulmonary trunk.

Several transcription factors have been implicated in different phases of cardiac chamber morphogenesis, being particularly important for atrial vs. ventricular chamber development the transcription factors Hey1, Hey2, Irx4, Coup-tfII and Tbx20, while Hand1 and Hand2 are of importance to systemic vs. pulmonary development of the ventricular chambers and Foxm1, Hop, Kfl13 and Srf for the development of compact vs. trabecular myocardium.

Indirect evidence has been reported on the plausible role of miR-34 regulating distinct components of the Notch signaling pathway, including therein Hey2 [260], as well as for miR-128 regulating Irx4 [118], however no direct interactions between microRNAs and Hey1, Hey2, Irx4 or Coup-tfII in the cardiovascular context have been reported to date (Figure 2C,D). Importantly, several reports in other biological contexts have been widely reported [261–267].

Another key factor for cardiovascular development is Tbx20, which is involved in processes such as the differentiation of cardiac chambers and the proliferation and differentiation of cardiomyocytes [268]. Despite the importance of this factor during cardiogenesis, only indirect evidence for miR-1, miR-25, miR-141, miR-185 and miR-200a has been described distinctly modulating Tbx20 expression during cardiogenesis [159] (Figure 2C,D).

On the other hand, several reports are available about the functional role of distinct microRNAs modulating the expression of the Hand1 and Hand2 transcription factors. It has been reported that miR-363 downregulates Hand1, suggesting that miR-363 contributes

to the generation of a functional left ventricle [269,270], and also Hand1 is modulated by let7 microRNA family members (mmu-let-7a/7d/7e/7f) at different stages in mouse heart development [271]. On the other hand, miR-1 and miR-133a directly target Hand2, balancing proliferation and differentiation during cardiogenesis [272–274] (Figure 2C,D).

Klf13 is a transcriptional factor important during cardiogenesis that physically interact with Gata4 [275]. At present two distinct microRNAs have been shown to directly interact with Klf13, miR-147b [276] and miR-125b [277] (Figure 2C,D).

Serum response factor (SRF) is a member of the superfamily MADS-box (MCM1, agamous, deficient, and SRF) of transcriptional factors and is highly expressed through embryonic, fetal and postnatal development of the heart. Srf regulates multiple target genes by the presence in their promoter of serum response elements, such as genes involved in metabolism, extracellular matrix deposition, gene transcription and protein translation [278]. Several microRNAs regulate Srf expression in distinct cardiovascular contexts, such as miR-483-3p in endothelial progenitor cells [279], miR-22 in human umbilical vein endothelial cells [280], miR-23, miR-93, miR-486 in cardiomyocytes [281] and miR-181 in vascular smooth muscle cells [282]. On the other hand, no evidence is reported on the ncRNA regulation of Foxm1 and Hop, despite their crucial role during cardiogenesis [283,284].

In contrast to our understanding of the impact of lncRNA during proepicardium and conduction system development, evidence of the role of lncRNA during chamber formation and valve development is widely emerging. Evidence on the modulation of Bmp2 has been reported in cardiac valves, mediated by H19 lncRNA. H19 administration silenced Notch1 expression by modulating the recruitment of p53 to its promoter and consequently, Bmp2 and Runx2 are downregulated, as they are downstream targets of Notch1 signalling [285] (Figure 3A,C). In addition, Hand2 transcription is modulated by *Upperhand (Uph)* [286], and this lncRNA is essential for proper cardiac development, as systemic deletion caused hypoplasia of the right ventricle and septal defects [287] (Figure 2C,D).

Furthermore, *Cardinal*, a myocardium adjacent lncRNA, regulates SRF-dependent mitogenic gene transcription as reported by Anderson et al. [288], while *MYOSLID*, an SRF-dependent lncRNA, is a direct transcriptional target of SRF and play essential roles regulating role differentiation while blocking proliferation in vascular smooth muscle cells. Curiously decreased *MYOSLID* expression does not affect SRF expression [289] (Figure 2C,D).

Liu et al. [290] described a regulatory network where *HBL1* lncRNA acts as a functional repressor of miR-1, thus inhibiting Tbx20 expression and cardiomyocyte differentiation. Smad4 is also regulated by lncRNAs. Xiao et al. [291] demonstrated that this transcriptional factor is downregulated by miR-204 which can be regulated by *Malat1* lncRNA acting thus as a miR-204 sponge (Figure 2C,D). Additionally, Klf2 is also regulated by lncRNAs but in other biological contexts, such as modulating monocyte adhesion to endothelial cells by *MANTIS* lncRNA [292] or acute myocardial infarction by *MALAT1* [293] (Figure 2C,D).

11. Post-Transcriptional Control of Outflow Tract and Atrioventricular Septation by ncRNAs

Septation of the heart involves the formation of distinct muscular septa, such as the primary and secondary atrial septa in the atrial chambers and the interventricular septum in the ventricular chambers, as well as remodeling of the sinoatrial, atrioventricular and conotruncal endocardial cushions eventually leading to the formation of a four-chambered heart. Within these developmental processes, Bmp, Wnt, Tgf-beta and Notch signaling play essential roles.

Besides their role in early cardiac specification, Bmp2 and Bmp4 also play an essential role in the differentiation of the outflow tract myocardium derived from the secondary cardiac field [18,19,294,295]. In this context, it has been reported that Bmp2 and Bmp4 induced the expression of two microRNAs encoded by the miR17-92 cluster, miR-17 and miR-20a [296]. Seed sequences of both microRNAs recognized the 3'UTRs from two cardiac progenitor genes, *Islet1* and *Tbx1* [297–299]. The absence of Bmp2/Bmp4 expression results

in a down-regulation of miR-17 and miR-20a and thus an increase in Islet1 and Tbx1 expression (Figure 3A,C). Gain and/or loss of function assay and dual-luciferase assays have shown that both microRNAs repress the expression of Islet1 and Tbx1. The down-regulation of miR-17 and miR-20a leads to sustained expression of both transcription factors in cardiac progenitors that prevent myocardial OFT differentiation. As a consequence of failure to silence Islet1 and Tbx1, the Bmp2/4 CKO mutants show a reduced and thickened OFT myocardium accompanied by a down-regulation of sarcomeric proteins such as Mhy6 or Mhy7 [296].

Bai et al. [294] demonstrated a pivotal role of Bmp4/7-miR 17-92 cluster in the development of OFT cushions. Bmp4 mutant mice have shown that it is necessary for OFT septation and cushion development [300] (Figure 3A,C). Interestingly, Bmp4 deficiency increases Bmp7 expression, suggesting a possible compensation mechanism and therefore the involvement in the same morphogenetic process. However, Bmp7 deletion does not result in a visible phenotype, demonstrating that its possible role is residual compared to Bmp4 [300]. Functional assays demonstrated that both induce miR-17-92 expression, which is necessary to correct outflow tract cushion development by inducing epithelial to mesenchymal transition (EMT) [294]. The miR-17-92 cluster triggers Vgfa2 mRNA, which represses EMT of the atrioventricular canal (AVC) [301]. Interestingly, SHF Bmp4/Bmp7 deficiency and the miR-17-92 cluster show similar phenotypes, resulting in a defect of EMT and a reduction in cardiac neural crest entry, with the consequent patent trunk arteriosus showing a function linked in the development of the outflow tract [300].

Functional role of Wnt signaling governing valve formation is extensively documented [302–308]. However, no evidence has been reported on the role of microRNAs regulating Wnt signaling during cardiac valve development yet. There are compelling evidence in cardiac valve pathological conditions, such as valvular calcification by miR-29b [309] and inflammation by miR-27a [310], as well as in other cardiac pathological conditions such as atrial fibrillation [311] regulating Wnt3 by miR-27b and ischemia/reperfusion regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway by miR-148b [10].

Tgf-beta signaling also plays a pivotal role in endocardial cushion formation [312–319], where indirect evidence for miR-23 and miR-199a was reported by Lagendijk et al. [320] and Bonet et al. [321] during cardiac valve formation, respectively (Figure 2A,D).

Notch signaling is widely implicated during valve formation [322–327]. Despite the prominent role of Notch signaling during cardiogenesis, only miR-34 has been reported as a direct modulator of Notch1 in embryonic endocardial cells [261] while additional evidence on the role of microRNAs regulating Notch signaling in aortic valve calcification has been reported for miR-34 and miR-29a [328–330] (Figure 3A,C).

Our current understanding of the transcriptional regulation of the cardiac muscular septa is still incipient, whereas several transcription factors such as Klf2, Sox9, Smad4 and Odd1 have been involved in endocardial cushion septation. Kuppel-like factor 2 (Klf2) is a very important molecule involved in angiogenesis and endothelial vascular formation and proliferation [331,332]. To date most of the evidence provided on the regulation of Klf2 by microRNAs are reported in pathological conditions, miR-92 and miR-32 regulate Klf2 expression in endothelial cells in acute myocardial infarction [331,333]. Similar evidence on the transcriptional control of Klf2 regulating microRNA expression has been reported in distinct biological settings, such as shear stress-inducing expression of miR-30 family members [334], miR-23b, miR-145 and miR-143 [332,335] while reducing the expression of miR-126-5p [332]. More recently, Sindi et al. [335] have shown that Klf2 has the ability to induce the presence of miR-181-5p and miR-324-5p in exosomes, reducing the vascular remodeling in pulmonary hypertension.

Sex-determining region Y box (Sox9) is a very important regulator of chondrocyte differentiation [336,337]. In cardiovascular development, it plays a crucial role regulating endocardial cushion formation and septation. In this context, Li et al. [337] demonstrated the existence of a regulation network between Sox9 and miR-1a as this miRNA downregulates Sox9 expression, correlating those findings with the onset of ventricular septal defects

(Figure 3A,C). Additionally, in the context of cardiac fibrosis, Cui et al. [336] established a correlation between miR-145 and Sox9 and verified those finding by dual luciferase assay while Cheng et al. [338] reported a direct regulation of Sox9 by miR-30e in an experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury.

Smad4 plays multiple roles in distinct developmental and adult tissues and thus is widely expressed. As part of the Tgf-beta signaling, its role during endocardial cushion formation has been widely documented [339,340]. Regulation of Smad4 by microRNAs have been documented in distinct cardiovascular settings [339,340], such as regulation by miR-34 and miR-122 in cardiac fibrosis [340], by miR-146a-5p in exosomes of human cardiac-resident mesenchymal progenitor cells (CPC) [341], by miR-26a in hypertension-induced myocardial fibrosis [342], yet the only evidence on the regulatory role of microRNAs in cardiovascular development has been established by Dong et al. [343]. These authors observed Smad4 downregulation and miR-144-3p and miR-544 up-regulation correlating with the presence of several cardiovascular defects (Figure 3A,C).

12. Post-Transcriptional Control of Aortic Arch Development by ncRNAs

Finally, a critical step in cardiac development requires the exquisite remodeling of the arterial and venous connections to provide appropriate systemic and venous connections and thus the establishment of a closed and double circulatory system. In this context, several transcription factors such as Tbx1, Foxc1, Foxc2, Prrx1, Prrx2 have been involved.

The Tbx1 gene is a member of the T-box transcription factor family which participates in the arrangement of pharyngeal arch endoderm, differentiation and migration of neural crest cells migration and cardiac outflow tract development [344]. During myocardial differentiation of cardiac progenitors in the secondary heart field, Tbx1 is directly downregulated by miR-17-92 cluster under the control of Bmp signaling [149]. Although Tbx1 is currently described as one of the core genes implicated in congenital heart disease (CHD), the molecular mechanisms underlying its role in the pathogenesis of this abnormality is not fully understood [345]. Recent studies, described by Cao et al. [346] showed that miR-144 inhibits cardiomyocyte proliferation and promotes cardiomyocyte apoptosis by targeting the 3'UTR of Tbx1 via regulating Jak2/Stat1 signaling pathway (Figure 3B,C).

The transcription factor Forkhead box C1 (Foxc1) is essential for cell proliferation, migration, invasion, as well as vascular formation and maturation [347,348]. Foxc1 is also implicated in the regulation of early cardiomyogenesis and the functional properties of ESC-derived cardiomyocytes [349]. Although its specific regulation remains largely unknown, some studies described non-coding RNAs as promising posttranscriptional regulators of this factor. In heart development, miR-322/-502 cluster up-regulated cardiac genes, such as Wnt2, Isl1, Tbx20 or Foxc1, involved in vascular endothelial cell differentiation [112] (Figure 3B,C). A negative correlation between Foxc1 and miR-511-3p expression levels has been discovered by Henn et al. [350] in a model for in vivo induction of neoangiogenesis.

Forkhead box C2 (Foxc2) participates in blood and lymphatic vessel development as well as regulating adipose cell metabolism [351]. This transcription factor is a predicted target of miR-199a-5p, a microRNA which has been implicated in cardiac remodeling regulation and ventricular hypertrophy [352]. In varicose vein tissues, the downregulation of this microRNA may promote vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation by upregulating Foxc2 [353].

The paired-related homeobox genes Prrx1 and Prrx2 are highly expressed in mesenchymal tissues throughout development, with the cardiovascular system being one of those with the highest transcript levels of Prrx genes reported. These transcriptional factors are implicated in matrix modulation and in the inhibition of adipogenesis activating TGF- β signaling pathway [354]. Prrx1, and other transcription factors such as Zeb or Snail, also plays an important role in the epithelial to mesenchymal transition (EMT) that occurs during embryonic heart development. In this process, Prrx1 attenuates Snail1 expression through direct activation of the miR-15 family promoting a decrease in stem cell properties [194] (Figure 3B,C).

At present, none of the main transcription factors currently involved in aortic arch development, such as *Tbx1*, *Prrx1*, *Prrx2*, *Foxc1* and *Foxc2* have been reported to be regulated by lncRNAs. However, there is evidence that the long-non-coding RNA (lncRNA) *LINC00242* competitively binds to miR-141 and promotes *Foxc1* expression accelerating the angiogenesis in gastric cancer [355] while in hepatocellular cancer, *Foxc1* binds to the upstream region of *HOTAIR*, a lncRNA highly expressed in cardiac tissues that may epigenetically regulate embryonic heart development by recruiting PRC2 [356].

13. Conclusions and Future Perspectives

Cardiovascular development is a complex developmental process in which multiple cell types are involved [357]. Over the last decades, our understanding of the cellular contribution to the developing heart has been enormous, particularly dissecting the deployment of distinct heart fields to the nascent cardiac tube [358,359] as well as the extracardiac contributions emanating from the epicardium and the cardiac neural crest [227,360]. Similarly, our understanding of molecular cascades governing these morphogenetic events has been equally impressive, by dissecting the functional role of multiple growth factors and transcription factors during cardiogenesis [357]. Recently, a novel layer of complexity has emerged with the discovery of non-coding RNAs and their impact on the gene regulatory networks that governed cardiac development. In this review, we have summarized our current understanding of the functional role of both microRNAs and lncRNAs at different stages of heart development. It is important to highlight that although our insights on the regulatory roles of these non-coding RNAs is still incipient, there is convincing evidence of their impact on early aspects of heart formation, ranging from early precardiac mesoderm modulation [94] to cardiac chamber formation and aortic arch remodeling [345]. It is important also to highlight in this context that although we are currently lacking evidence of the functional role of microRNAs and lncRNAs in a large number of molecular determinants that play essential roles during cardiogenesis, there is ample evidence in other biological contexts. For example, regulation of microRNAs by *Bmp4* has been reported in other biological settings, such as angiogenesis [361] as well as during cardiac valve calcification, i.e., miR-141, miR-486, miR-204, miR-30 [362–365]. Similarly, a large body of evidence have been reported on the microRNA modulation of Tgf-beta signaling in cardiac physiopathology, particularly on fibrosis [366–373] involving distinct microRNAs, such as miR-34a/miR-93 [366], miR-21 [367], miR-155 [368], miR-27 [369], miR-22 [370], miR-23 [371] and miR-30c [372].

Similar evidence is also applicable for lncRNAs. A recent study reported increased expression of *SNHG6* lncRNA in ventricular septal defects patients while functionally *SNHG6* lncRNA overexpression modulates miR-101 and Wnt/beta signaling, supporting a plausible role in congenital heart disease [373]. Zhao et al. [374] identified that *NORAD* directly binds to miR-590-3p in human umbilical vein endothelial cells and miR-590-3p directly target proangiogenic agents, such as *Vegf*, *Fgf1* and *Fgf2*. On the other hand, Sun et al., [375], identified that *TUG1* served as a sponge for miR-590 and *Fgf1* is a direct target of miR-590. Importantly, *TUG1* expression is increased in AMI tissues and cardiac fibroblasts treated with Tgf- β 1. More recently, evidence of Wnt regulated lncRNA *Walras* was reported, demonstrating a role for this lncRNA in cardiomyocyte cytoarchitecture in the context of atrial fibrillation [376]. Overall, these data support the notion that in next coming years we will greatly enlarge our understanding of the impact of microRNAs and lncRNAs, their interactive networks on each and every aspect of cardiac development. Moreover, it is also expected that a novel class of non-coding RNA, i.e., circRNAs, that at present have been scarcely implicated in cardiac development [377], will also pop up.

Funding: This research was funded by Junta de Andalucía Research Council, grant-in aid number CTS-446 to D.F. and AA, FEDER-UJA grant (1259108) to D.F. and A.A. and by a grant from the Ministry of Science, Innovation and Universities of the Spanish Government (PID2019-107492GB-I00) to D.F. and A.A.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Wijk, B.; Moorman, A.F.M.; van den Hoff, M.J.B. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 244–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wang, R.N.; Green, J.; Wang, Z.; Deng, Y.; Qiao, M.; Peabody, M.; Zhang, Q.; Ye, J.; Yan, Z.; Denduluri, S.; et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **2014**, *1*, 87–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Khosravi, F.; Ahmadvand, N.; Bellusci, S.; Sauer, H. The Multifunctional Contribution of FGF Signaling to Cardiac Development, Homeostasis, Disease and Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 672935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kruithof, B.P.; van Wijk, B.; Somi, S.; Julio, M.K.-D.; Pomares, J.M.P.; Weesie, F.; Wessels, A.; Moorman, A.F.; Hoff, M.J.V.D. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev. Biol.* **2006**, *295*, 507–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Van Wijk, B.; van den Berg, G.; Abu-Issa, R.; Barnett, P.; van der Velden, S.; Schmidt, M.; Ruijter, J.M.; Kirby, M.L.; Moorman, A.F.; Hoff, M.J.V.D. Epicardium and Myocardium Separate From a Common Precursor Pool by Crosstalk Between Bone Morphogenetic Protein- and Fibroblast Growth Factor-Signaling Pathways. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 431–441. [[CrossRef](#)]
6. Torlopp, A.; Schlueter, J.; Brand, T. Role of fibroblast growth factor signaling during proepicardium formation in the chick embryo. *Dev. Dyn.* **2010**, *239*, 2393–2403. [[CrossRef](#)]
7. Ishii, Y.; Garriock, R.J.; Navetta, A.M.; Coughlin, L.E.; Mikawa, T. BMP Signals Promote Proepicardial Protrusion Necessary for Recruitment of Coronary Vessel and Epicardial Progenitors to the Heart. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 307–316. [[CrossRef](#)]
8. Andrés-Delgado, L.; Ernst, A.; Galardi-Castilla, M.; Bazaga, D.; Peralta, M.; Münch, J.; González-Rosa, J.M.; Marques, I.; Tessadori, F.; de la Pompa, J.L.; et al. Actin dynamics and the Bmp pathway drive apical extrusion of proepicardial cells. *Development* **2019**, *146*, dev174961. [[CrossRef](#)]
9. Andrés-Delgado, L.; Galardi-Castilla, M.; Münch, J.; Peralta, M.; Ernst, A.; González-Rosa, J.M.; Tessadori, F.; Santamaría, L.; Bakkers, J.; Vermot, J.; et al. Notch and Bmp signaling pathways act coordinately during the formation of the proepicardium. *Dev. Dyn.* **2020**, *249*, 1455–1469. [[CrossRef](#)]
10. Yamagishi, T.; Ando, K.; Nakamura, H. Roles of TGF β and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. *Anat. Sci. Int.* **2009**, *84*, 77–87. [[CrossRef](#)]
11. Kruithof, B.P.; Duim, S.N.; Moerkamp, A.T.; Goumans, M.-J. TGF β and BMP signaling in cardiac cushion formation: Lessons from mice and chicken. *Differentiation* **2012**, *84*, 89–102. [[CrossRef](#)]
12. Saxon, J.G.; Baer, D.R.; Barton, J.A.; Hawkins, T.; Wu, B.; Trusk, T.C.; Harris, S.E.; Zhou, B.; Mishina, Y.; Sugi, Y. BMP2 expression in the endocardial lineage is required for AV endocardial cushion maturation and remodeling. *Dev. Biol.* **2017**, *430*, 113–128. [[CrossRef](#)]
13. Inai, K.; Burnside, J.L.; Hoffman, S.; Toole, B.P.; Sugi, Y. BMP-2 Induces Versican and Hyaluronan That Contribute to Post-EMT AV Cushion Cell Migration. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77593. [[CrossRef](#)]
14. Zhang, J.; Chang, J.Y.-F.; Huang, Y.; Lin, X.; Luo, Y.; Schwartz, R.J.; Martin, J.F.; Wang, F. The FGF-BMP Signaling Axis Regulates Outflow Tract Valve Primordium Formation by Promoting Cushion Neural Crest Cell Differentiation. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1209–1219. [[CrossRef](#)]
15. Sugi, Y.; Ito, N.; Szebenyi, G.; Myers, K.; Fallon, J.F.; Mikawa, T.; Markwald, R.R. Fibroblast growth factor (FGF)-4 can induce proliferation of cardiac cushion mesenchymal cells during early valve leaflet formation. *Dev. Biol.* **2003**, *258*, 252–263. [[CrossRef](#)]
16. Nakajima, Y.; Yamagishi, T.; Hokari, S.; Nakamura, H. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat. Rec.* **2000**, *258*, 119–127. [[CrossRef](#)]
17. Todorovic, V.; Friendewey, D.; Gutstein, D.E.; Chen, Y.; Freyer, L.; Finnegan, E.; Liu, F.; Murphy, A.; Valenzuela, D.; Yancopoulos, G.; et al. Long form of latent TGF- β binding protein 1 (Ltbp1L) is essential for cardiac outflow tract septation and remodeling. *Development* **2007**, *134*, 3723–3732. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, R.; Cao, P.; Yang, Z.; Wang, Z.; Wu, J.-L.; Chen, Y.; Pan, Y. Heparan Sulfate Biosynthesis Enzyme, Ext1, Contributes to Outflow Tract Development of Mouse Heart via Modulation of FGF Signaling. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136518. [[CrossRef](#)]
19. Beppu, H.; Malhotra, R.; Beppu, Y.; Lepore, J.J.; Parmacek, M.S.; Bloch, K.D. BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis. *Dev. Biol.* **2009**, *331*, 167–175. [[CrossRef](#)]
20. Wang, J.; Liu, S.; Heallen, T.; Martin, J.F. The Hippo pathway in the heart: Pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* **2018**, *15*, 672–684. [[CrossRef](#)]
21. Heallen, T.; Zhang, M.; Wang, J.; Bonilla-Claudio, M.; Klysik, E.; Johnson, R.L.; Martin, J.F. Hippo Pathway Inhibits Wnt Signaling to Restrain Cardiomyocyte Proliferation and Heart Size. *Science* **2011**, *332*, 458–461. [[CrossRef](#)]
22. Zhou, Q.; Li, L.; Zhao, B.; Guan, K.-L. The Hippo Pathway in Heart Development, Regeneration, and Diseases. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1431–1447. [[CrossRef](#)]
23. D’Amato, G.; Luxán, G.; Mínguez, J.L.D.L.P. Notch signalling in ventricular chamber development & cardiomyopathy. *FEBS J.* **2016**, *283*, 4223–4237. [[CrossRef](#)]
24. D’Amato, G.; Luxán, G.; Nieto, G.D.M.; Poveda, B.M.; Torroja, C.; Walter, W.; Bochter, M.S.; Benedito, R.; Cole, S.E.; Martínez, F.; et al. Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *18*, 7–20. [[CrossRef](#)]

25. Samsa, L.; Givens, C.; Tzima, E.; Stainier, D.; Qian, L.; Liu, J. Cardiac contraction activates endocardial Notch signaling to modulate chamber maturation in zebrafish. *Development* **2015**, *142*, 4080–4091. [[CrossRef](#)]
26. Yang, Y.; Li, B.; Zhang, X.; Zhao, Q.; Lou, X. The zinc finger protein Zfp116 modulates ventricular trabeculation through Neuregulin-ErbB signalling. *Dev. Biol.* **2019**, *446*, 142–150. [[CrossRef](#)]
27. Zhao, Y.-Y.; Sawyer, D.R.; Baliga, R.R.; Opel, D.J.; Han, X.; Marchionni, M.A.; Kelly, R.A. Neuregulins Promote Survival and Growth of Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10261–10269. [[CrossRef](#)]
28. Hertig, C.M.; Kubalak, S.W.; Wang, Y.; Chien, K.R. Synergistic Roles of Neuregulin-1 and Insulin-like Growth Factor-I in Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway and Cardiac Chamber Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37362–37369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lai, D.; Liu, X.; Forrai, A.; Wolstein, O.; Michalick, J.; Ahmed, I.; Garratt, A.N.; Birchmeier, C.; Zhou, M.; Hartley, L.; et al. Neuregulin 1 Sustains the Gene Regulatory Network in Both Trabecular and Nontrabecular Myocardium. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 715–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Saga, Y.; Miyagawa-Tomita, S.; Takagi, A.; Kitajima, S.; Miyazaki, J.-I.; Inoue, T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* **1999**, *126*, 3437–3447. [[CrossRef](#)]
31. Saga, Y. MesP1 Expression Is the Earliest Sign of Cardiovascular Development. *Trends Cardiovasc. Med.* **2000**, *10*, 345–352. [[CrossRef](#)]
32. Kitajima, S.; Takagi, A.; Inoue, T.; Saga, Y. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* **2000**, *127*, 3215–3226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Laverriere, A.C.; MacNeill, C.; Mueller, C.; Poelmann, R.E.; Burch, J.B.; Evans, T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23177–23184. [[CrossRef](#)]
34. Charron, F.; Nemer, M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **1999**, *10*, 85–91. [[CrossRef](#)]
35. Belaguli, N.S.; Sepulveda, J.L.; Nigam, V.; Charron, F.; Nemer, M.; Schwartz, R.J. Cardiac Tissue Enriched Factors Serum Response Factor and GATA-4 Are Mutual Coregulators. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 7550–7558. [[CrossRef](#)]
36. Durocher, D.; Charron, F.; Warren, R.; Schwartz, R.J.; Nemer, M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **1997**, *16*, 5687–5696. [[CrossRef](#)]
37. Jiang, Y.; Evans, T. The Xenopus GATA-4/5/6 Genes Are Associated with Cardiac Specification and Can Regulate Cardiac-Specific Transcription during Embryogenesis. *Dev. Biol.* **1996**, *174*, 258–270. [[CrossRef](#)]
38. Harvey, R. NK-2 Homeobox Genes and Heart Development. *Dev. Biol.* **1996**, *178*, 203–216. [[CrossRef](#)]
39. Biben, C.; Harvey, R.P. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 1357–1369. [[CrossRef](#)]
40. Lin, Q.; Schwarz, J.; Bucana, C.; Olson, E.N. Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C. *Science* **1997**, *276*, 1404–1407. [[CrossRef](#)]
41. Croissant, J.D.; Kim, J.-H.; Eichele, G.; Goering, L.; Lough, J.; Prywes, R.; Schwartz, R.J. Avian Serum Response Factor Expression Restricted Primarily to Muscle Cell Lineages Is Required for α -Actin Gene Transcription. *Dev. Biol.* **1996**, *177*, 250–264. [[CrossRef](#)]
42. Kim, S.; Ip, H.S.; Lu, M.M.; Clendenin, C.; Parmacek, M.S. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 2266–2278. [[CrossRef](#)]
43. Ocaña, O.H.; Coskun, H.; Minguillón, C.; Murawala, P.; Tanaka, E.M.; Galceran, J.; Muñoz-Chápuli, R.; Nieto, M.A. A right-handed signalling pathway drives heart looping in vertebrates. *Nature* **2017**, *549*, 86–90. [[CrossRef](#)]
44. Ammirabile, G.; Tessari, A.; Pignataro, V.; Szumska, D.; Sardo, F.S.; Benes, J.; Balistreri, M.; Bhattacharya, S.; Sedmera, D.; Campione, M. Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *93*, 291–301. [[CrossRef](#)]
45. Campione, M.; Ros, M.; Icardo, J.M.; Piedra, E.; Christoffels, V.M.; Schweickert, A.; Blum, M.; Franco, D.; Moorman, A.F. Pitx2 Expression Defines a Left Cardiac Lineage of Cells: Evidence for Atrial and Ventricular Molecular Isomerism in the iv/iv Mice. *Dev. Biol.* **2001**, *231*, 252–264. [[CrossRef](#)]
46. Campione, M.; Acosta, L.; Martinez, S.; Icardo, J.; Aranega, A.; Franco, D. Pitx2 and Cardiac Development: A Molecular Link between Left/Right Signaling and Congenital Heart Disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2002**, *67*, 89–96. [[CrossRef](#)]
47. Franco, D.; Campione, M.; Kelly, R.; Zammit, P.S.; Buckingham, M.; Lamers, W.H.; Moorman, A.F.M. Multiple transcriptional domains, with distinct left and right components, in the atrial chambers of the developing heart. *Circ. Res.* **2000**, *87*, 984–991. [[CrossRef](#)]
48. Campione, M.; Franco, D. Current Perspectives in Cardiac Laterality. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2016**, *3*, 34. [[CrossRef](#)]
49. Xu, H.; Morishima, M.; Wylie, J.N.; Schwartz, R.J.; Bruneau, B.G.; Lindsay, E.A.; Baldini, A. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development* **2004**, *131*, 3217–3227. [[CrossRef](#)]
50. Zhang, Z.; Huynh, T.; Baldini, A. Mesodermal expression of Tbx1 is necessary and sufficient for pharyngeal arch and cardiac outflow tract development. *Development* **2006**, *133*, 3587–3595. [[CrossRef](#)]
51. Greulich, F.; Rudat, C.; Kispert, A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *91*, 212–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Aanhaanen, W.T.; Brons, J.F.; Domínguez, J.N.; Rana, M.S.; Norden, J.; Airik, R.; Wakker, V.; Vries, C.D.G.-D.; Brown, N.A.; Kispert, A.; et al. The Tbx2⁺ Primary Myocardium of the Atrioventricular Canal Forms the Atrioventricular Node and the Base of the Left Ventricle. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 1267–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Takeuchi, J.K.; Ohgi, M.; Koshiba-Takeuchi, K.; Shiratori, H.; Sakaki, I.; Ogura, K.; Saijoh, Y.; Ogura, T. Tbx5 specifies the left/right ventricles and ventricular septum position during cardiogenesis. *Development* **2003**, *130*, 5953–5964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moskowitz, I.P.G.; Pizard, A.; Patel, V.V.; Bruneau, B.; Kim, J.B.; Kupersmidt, S.; Roden, D.; Berul, C.I.; Seidman, C.E.; Seidman, J.G. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development* **2004**, *131*, 4107–4116. [[CrossRef](#)]
55. Bruneau, B.G.; Logan, M.; Davis, N.; Levi, T.; Tabin, C.J.; Seidman, J.G.; Seidman, C.E. Chamber-Specific Cardiac Expression of Tbx5 and Heart Defects in Holt–Oram Syndrome. *Dev. Biol.* **1999**, *211*, 100–108. [[CrossRef](#)]
56. Bruneau, B.; Nemer, G.; Schmitt, J.P.; Charron, F.; Robitaille, L.; Caron, S.; Conner, D.A.; Gessler, M.; Nemer, M.; Seidman, C.E.; et al. A Murine Model of Holt–Oram Syndrome Defines Roles of the T-Box Transcription Factor Tbx5 in Cardiogenesis and Disease. *Cell* **2001**, *106*, 709–721. [[CrossRef](#)]
57. Greulich, F.; Farin, H.F.; Schuster-Gessler, K.; Kispert, A. Tbx18 function in epicardial development. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *96*, 476–483. [[CrossRef](#)]
58. Wu, S.-P.; Dong, X.-R.; Regan, J.N.; Su, C.; Majesky, M.W. Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels. *Dev. Biol.* **2013**, *383*, 307–320. [[CrossRef](#)]
59. Firulli, A.B.; McFadden, D.G.; Lin, Q.; Srivastava, D.; Olson, E.N. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 266–270. [[CrossRef](#)]
60. Riley, P.; Anaon-Cartwright, L.; Cross, J.C. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 271–275. [[CrossRef](#)]
61. Srivastava, D.; Cserjesi, P.; Olson, E.N. A Subclass of bHLH Proteins Required for Cardiac Morphogenesis. *Science* **1995**, *270*, 1995–1999. [[CrossRef](#)]
62. Thomas, T.; Yamagishi, H.; Overbeek, P.A.; Olson, E.N.; Srivastava, D. The bHLH Factors, dHAND and eHAND, Specify Pulmonary and Systemic Cardiac Ventricles Independent of Left–Right Sidedness. *Dev. Biol.* **1998**, *196*, 228–236. [[CrossRef](#)]
63. Pereira, F.; Qiu, Y.; Zhou, G.; Tsai, M.-J.; Tsai, S.Y. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1037–1049. [[CrossRef](#)]
64. Fischer, A.; Schumacher, N.; Maier, M.; Sendtner, M.; Gessler, M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 901–911. [[CrossRef](#)]
65. Nakagawaab, O.; Nakagawaab, M.; Richardson, J.A.; Olson, E.N.; Srivastava, D. HRT1, HRT2, and HRT3: A New Subclass of bHLH Transcription Factors Marking Specific Cardiac, Somitic, and Pharyngeal Arch Segments. *Dev. Biol.* **1999**, *216*, 72–84. [[CrossRef](#)]
66. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 861–874. [[CrossRef](#)]
67. Hombach, S.; Kretz, M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *937*, 3–17. [[CrossRef](#)]
68. Ounzain, S.; Crippa, S.; Pedrazzini, T. Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration. *Biochim. et Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 923–933. [[CrossRef](#)]
69. Chen, J.; Wang, D.-Z. microRNAs in cardiovascular development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *52*, 949–957. [[CrossRef](#)]
70. Beermann, J.; Piccoli, M.-T.; Viereck, J.; Thum, T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 1297–1325. [[CrossRef](#)]
71. Poller, W.; Dimmeler, S.; Heymans, S.; Zeller, T.; Haas, J.; Karakas, M.; Leistner, D.M.; Jakob, P.; Nakagawa, S.; Blankenberg, S.; et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: Diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 2704–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Dykes, I.M.; Emanuelli, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2017**, *15*, 177–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Statello, L.; Guo, C.-J.; Chen, L.-L.; Huarte, M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 96–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhang, K.; Shi, Z.-M.; Chang, Y.-N.; Hu, Z.-M.; Qi, H.-X.; Hong, W. The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. *Gene* **2014**, *547*, 1–9. [[CrossRef](#)]
75. Wojciechowska, A.; Braniewska, A.; Kozar-Kamińska, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 868–874. [[CrossRef](#)]
76. Barwari, T.; Joshi, A.; Mayr, M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *68*, 2577–2584. [[CrossRef](#)]
77. Wong, L.L.; Wang, J.; Liew, O.W.; Richards, A.M.; Chen, Y.-T. MicroRNA and Heart Failure. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 502. [[CrossRef](#)]
78. Ha, M.; Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 509–524. [[CrossRef](#)]
79. Lin, S.; Gregory, R.I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Cancer* **2015**, *15*, 321–333. [[CrossRef](#)]
80. Ransohoff, J.D.; Wei, Y.; Khavari, P.A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 143–157. [[CrossRef](#)]
81. Bhan, A.; Soleimani, M.; Mandal, S.S. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3965–3981. [[CrossRef](#)]
82. Dahariya, S.; Paddibhatla, I.; Kumar, S.; Raghuwanshi, S.; Palapati, A.; Gutti, R.K. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells. *Mol. Immunol.* **2019**, *112*, 82–92. [[CrossRef](#)]

83. Yuan, Z.; Huang, W. New Developments in Exosomal lncRNAs in Cardiovascular Diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 709169. [[CrossRef](#)]
84. Zheng, D.; Huo, M.; Li, B.; Wang, W.; Piao, H.; Wang, Y.; Zhu, Z.; Li, D.; Wang, T.; Liu, K. The Role of Exosomes and Exosomal MicroRNA in Cardiovascular Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 616161. [[CrossRef](#)]
85. Barron, M.; Gao, M.; Lough, J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev. Dyn.* **2000**, *218*, 383–393. [[CrossRef](#)]
86. Lough, J.; Barron, M.; Brogley, M.; Sugi, Y.; Bolender, D.L.; Zhu, X. Combined BMP-2 and FGF-4, but Neither Factor Alone, Induces Cardiogenesis in Non-Precardiac Embryonic Mesoderm. *Dev. Biol.* **1996**, *178*, 198–202. [[CrossRef](#)]
87. Schultheiss, T.M.; Burch, J.B.; Lassar, A.B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 451–462. [[CrossRef](#)]
88. Zhang, H.; Bradley, A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* **1996**, *122*, 2977–2986. [[CrossRef](#)]
89. Sugi, Y.; Yamamura, H.; Okagawa, H.; Markwald, R.R. Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation of atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. *Dev. Biol.* **2004**, *269*, 505–518. [[CrossRef](#)]
90. Luna-Zurita, L.; Prados, B.; Grego-Bessa, J.; Luxán, G.; del Monte, G.; Benguría, A.; Adams, R.H.; Pérez-Pomares, J.M.; de la Pompa, J.L. Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 3493–3507. [[CrossRef](#)]
91. Winnier, G.; Blessing, M.; Labosky, P.A.; Hogan, B.L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2105–2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Waldo, K.L.; Kumiski, D.H.; Wallis, K.T.; Stadt, H.A.; Hutson, M.R.; Platt, D.H.; Kirby, M.L. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* **2001**, *128*, 3179–3188. [[CrossRef](#)]
93. Bernardo, A.S.; Faial, T.; Gardner, L.; Niakan, K.K.; Ortmann, D.; Senner, C.E.; Callery, E.M.; Trotter, M.W.; Hemberger, M.; Smith, J.C.; et al. BRACHYURY and CDX2 Mediate BMP-Induced Differentiation of Human and Mouse Pluripotent Stem Cells into Embryonic and Extraembryonic Lineages. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 144–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Lopez-Sanchez, C.; Franco, D.; Bonet, F.; Garcia-Lopez, V.; Aranega, A.; Martinez, F.B. Negative Fgf8-Bmp2 feed-back is regulated by miR-130 during early cardiac specification. *Dev. Biol.* **2015**, *406*, 63–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Eisenberg, C.A.; Eisenberg, L.M. WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Dev. Dyn.* **1999**, *216*, 45–58. [[CrossRef](#)]
96. Ueno, S.; Weidinger, G.; Osugi, T.; Kohn, A.D.; Golob, J.L.; Pabon, L.; Reinecke, H.; Moon, R.T.; Murry, C.E. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 9685–9690. [[CrossRef](#)]
97. Afouda, B.A.; Hoppler, S. Different requirements for GATA factors in cardiogenesis are mediated by non-canonical Wnt signaling. *Dev. Dyn.* **2011**, *240*, 649–662. [[CrossRef](#)]
98. Samuel, L.J.; Latinkić, B.V. Early Activation of FGF and Nodal Pathways Mediates Cardiac Specification Independently of Wnt/ β -Catenin Signaling. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7650. [[CrossRef](#)]
99. Klaus-Bergmann, A.; Saga, Y.; Taketo, M.M.; Tzahor, E.; Birchmeier, W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18531–18536. [[CrossRef](#)]
100. Gessert, S.; Kühl, M. The Multiple Phases and Faces of Wnt Signaling During Cardiac Differentiation and Development. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 186–199. [[CrossRef](#)]
101. Onizuka, T.; Yuasa, S.; Kusumoto, D.; Shimoji, K.; Egashira, T.; Ohno, Y.; Kageyama, T.; Tanaka, T.; Hattori, F.; Fujita, J.; et al. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *52*, 650–659. [[CrossRef](#)]
102. Medley, T.L.; Furtado, M.; Lam, N.T.; Idrizi, R.; Williams, D.; Verma, P.J.; Costa, M.; Kaye, D.M. Effect of Oxygen on Cardiac Differentiation in Mouse iPS Cells: Role of Hypoxia Inducible Factor-1 and Wnt/Beta-Catenin Signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80280. [[CrossRef](#)]
103. Wang, Y.; Liu, J.; Cui, J.; Sun, M.; Du, W.; Chen, T.; Ming, X.; Zhang, L.; Tian, J.; Li, J.; et al. MiR218 Modulates Wnt Signaling in Mouse Cardiac Stem Cells by Promoting Proliferation and Inhibiting Differentiation through a Positive Feedback Loop. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20968. [[CrossRef](#)]
104. Wang, D.; Liu, C.; Wang, Y.; Wang, W.; Wang, K.; Wu, X.; Li, Z.; Zhao, C.; Li, L.; Peng, L. Impact of miR-26b on cardiomyocyte differentiation in P19 cells through regulating canonical/non-canonical Wnt signalling. *Cell Prolif.* **2017**, *50*, e12371. [[CrossRef](#)]
105. Liu, X.; Yang, L.; Wang, H.; Xu, G.; Zhu, S.; Li, M.; Hu, X.; Zhu, J.; Zhu, C.; Xu, J.; et al. Effects of miR-19b knockdown on the cardiac differentiation of P19 mouse embryonic carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *11*, 2504–2512. [[CrossRef](#)]
106. Qin, D.-N.; Qian, L.; Hu, D.-L.; Yu, Z.-B.; Han, S.-P.; Zhu, C.; Wang, X.; Hu, X. Effects of miR-19b Overexpression on Proliferation, Differentiation, Apoptosis and Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in P19 Cell Model of Cardiac Differentiation In Vitro. *Cell Biophys.* **2013**, *66*, 709–722. [[CrossRef](#)]
107. Lu, T.-Y.; Lin, B.; Li, Y.; Arora, A.; Han, L.; Cui, C.; Coronello, C.; Sheng, Y.; Benos, P.V.; Yang, L. Overexpression of microRNA-1 promotes cardiomyocyte commitment from human cardiovascular progenitors via suppressing WNT and FGF signaling pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *63*, 146–154. [[CrossRef](#)]

108. Xu, J.; Gruber, P.J.; Chien, K.R. SMAD4 Is Essential for Human Cardiac Mesodermal Precursor Cell Formation. *Stem Cells* **2018**, *37*, 216–225. [[CrossRef](#)]
109. López-Sánchez, C.; Climent, V.; Schoenwolf, G.; Álvarez, I.; García-Martínez, V. Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.* **2002**, *309*, 237–249. [[CrossRef](#)]
110. Coppola, A.; Romito, A.; Borel, C.; Gehrig, C.; Gagnebin, M.; Falconnet, E.; Izzo, A.; Altucci, L.; Banfi, S.; Antonarakis, S.; et al. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. *Stem Cell Res.* **2014**, *12*, 323–337. [[CrossRef](#)]
111. Chen, X.; Wang, L.; Huang, R.; Qiu, H.; Wang, P.; Wu, D.; Zhu, Y.; Ming, J.; Wang, Y.; Wang, J.; et al. Dgcr8 deletion in the primitive heart uncovered novel microRNA regulating the balance of cardiac-vascular gene program. *Protein Cell* **2019**, *10*, 327–346. [[CrossRef](#)]
112. Shen, X.; Soibam, B.; Benham, A.; Xu, X.; Chopra, M.; Peng, X.; Yu, W.; Bao, W.; Liang, R.; Azares, A.; et al. miR-322/-503 cluster is expressed in the earliest cardiac progenitor cells and drives cardiomyocyte specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 9551–9556. [[CrossRef](#)]
113. Yao, C.-X.; Wei, Q.-X.; Zhang, Y.-Y.; Wang, W.-P.; Xue, L.-X.; Yang, F.; Zhang, S.-F.; Xiong, C.-J.; Li, W.-Y.; Wei, Z.-R.; et al. miR-200b targets GATA-4 during cell growth and differentiation. *RNA Biol.* **2013**, *10*, 465–480. [[CrossRef](#)]
114. Han, M.; Yang, Z.; Sayed, D.; He, M.; Gao, S.; Lin, L.; Yoon, S.; Abdellatif, M. GATA4 expression is primarily regulated via a miR-26b-dependent post-transcriptional mechanism during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *93*, 645–654. [[CrossRef](#)]
115. Chen, Z.; Zhang, S.; Guo, C.; Li, J.; Sang, W. Downregulation of miR-200c protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting GATA-4. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 1589–1596. [[CrossRef](#)]
116. Kay, M.; Soltani, B.M.; Aghdaei, F.H.; Ansari, H.; Baharvand, H. Hsa-miR-335 regulates cardiac mesoderm and progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 191. [[CrossRef](#)]
117. Qian, L.; Wythe, J.D.; Liu, J.; Cartry, J.; Vogler, G.; Mohapatra, B.; Otway, R.T.; Huang, Y.; King, I.N.; Maillet, M.; et al. Tinman/Nkx2-5 acts via miR-1 and upstream of Cdc42 to regulate heart function across species. *J. Cell Biol.* **2011**, *193*, 1181–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Hoelscher, S.C.; Stich, T.; Diehm, A.; Lahm, H.; Dreßen, M.; Zhang, Z.; Neb, I.; Aherrahrou, Z.; Erdmann, J.; Schunkert, H.; et al. miR-128a Acts as a Regulator in Cardiac Development by Modulating Differentiation of Cardiac Progenitor Cell Populations. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Arasaratnam, D.; Bell, K.M.; Sim, C.B.; Koutsis, K.; Anderson, D.J.; Qian, E.L.; Stanley, E.G.; Elefanty, A.G.; Cheung, M.M.; Oshlack, A.; et al. The role of cardiac transcription factor NKX2-5 in regulating the human cardiac miRNAome. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 15928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Wu, M.; Wu, D.; Wang, C.; Guo, Z.; Li, B.; Zuo, Z. Hexabromocyclododecane exposure induces cardiac hypertrophy and arrhythmia by inhibiting miR-1 expression via up-regulation of the homeobox gene Nkx2.5. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *302*, 304–313. [[CrossRef](#)]
121. Chinchilla, A.; Lozano, E.; Daimi, H.; Esteban, F.J.; Crist, C.; Aranega, A.E.; Franco, D. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: A role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *89*, 98–108. [[CrossRef](#)]
122. Chen, H.-P.; Wen, J.; Tan, S.-R.; Kang, L.-M.; Zhu, G.-C. MiR-199a-3p inhibition facilitates cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cell through promotion of MEF2C. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 23315–23325. [[CrossRef](#)]
123. Xu, M.; Chen, X.; Chen, D.; Yu, B.; Li, M.; He, J.; Huang, Z. MicroRNA-499-5p regulates skeletal myofiber specification via NFATc1/MEF2C pathway and Thrap1/MEF2C axis. *Life Sci.* **2018**, *215*, 236–245. [[CrossRef](#)]
124. Shi, Y.; Mao, X.; Cai, M.; Hu, S.; Lai, X.; Chen, S.; Jia, X.; Wang, J.; Lai, S. miR-194-5p negatively regulates the proliferation and differentiation of rabbit skeletal muscle satellite cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2020**, *476*, 425–433. [[CrossRef](#)]
125. Cheng, X.; Du, J.; Shen, L.; Tan, Z.; Jiang, D.; Jiang, A.; Li, Q.; Tang, G.; Jiang, Y.; Wang, J.; et al. MiR-204-5p regulates C2C12 myoblast differentiation by targeting MEF2C and ERRγ. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *101*, 528–535. [[CrossRef](#)]
126. Gagan, J.; Dey, B.K.; Layer, R.; Yan, Z.; Dutta, A. Notch3 and Mef2c Proteins Are Mutually Antagonistic via Mkp1 Protein and miR-1/206 MicroRNAs in Differentiating Myoblasts. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 40360–40370. [[CrossRef](#)]
127. Tang, C.-M.; Liu, F.-Z.; Zhu, J.-N.; Fu, Y.-H.; Lin, Q.-X.; Deng, C.-Y.; Hu, Z.-Q.; Yang, H.; Zheng, X.-L.; Cheng, J.-D.; et al. Myocyte-specific enhancer factor 2C: A novel target gene of miR-214-3p in suppressing angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36146. [[CrossRef](#)]
128. Zhang, R.; Sui, L.; Hong, X.; Yang, M.; Li, W. MiR-448 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration in through directly targeting MEF2C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 22294–22300. [[CrossRef](#)]
129. Klattenhoff, C.A.; Scheuermann, J.C.; Surface, L.E.; Bradley, R.K.; Fields, P.A.; Steinhauser, M.L.; Ding, H.; Butty, V.L.; Torrey, L.; Haas, S.; et al. Braveheart, a Long Noncoding RNA Required for Cardiovascular Lineage Commitment. *Cell* **2013**, *152*, 570–583. [[CrossRef](#)]
130. Hou, J.; Long, H.; Zhou, C.; Zheng, S.; Wu, H.; Guo, T.; Wu, Q.; Zhong, T.; Wang, T. Long noncoding RNA Braveheart promotes cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 4. [[CrossRef](#)]
131. García-Padilla, C.; Domínguez, J.N.; Aránega, A.E.; Franco, D. Differential chamber-specific expression and regulation of long non-coding RNAs during cardiac development. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, *1862*, 194435. [[CrossRef](#)]
132. Yin, A.; Feng, M.; Cheng, Z.; Zhang, Q.; Li, H.; Xu, J.; Zhang, H.; Li, Y.; Qian, L. Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA uc.167 Inhibits Cell Differentiation in Heart Development. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 4658024. [[CrossRef](#)]

133. Liu, H.; Hu, Y.; Yin, J.; Yan, X.; Chen, W.; Wang, X.; Han, S.; Yu, Z.; Li, M. Effects of long non-coding RNA uc.245 on cardiomyocyte-like differentiation in P19 cells via FOG2. *Gene* **2019**, *694*, 83–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Song, G.; Shen, Y.; Ruan, Z.; Li, X.; Chen, Y.; Yuan, W.; Ding, X.; Zhu, L.; Qian, L. LncRNA-uc.167 influences cell proliferation, apoptosis and differentiation of P19 cells by regulating Mef2c. *Gene* **2016**, *590*, 97–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Yang, J.-H.; Chang, M.-W.; Pandey, P.R.; Tsitsipatis, D.; Yang, X.; Martindale, J.L.; Munk, R.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Interaction of OIP5-AS1 with MEF2C mRNA promotes myogenic gene expression. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 12943–12956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Kim, N.-J.; Lee, K.-H.; Son, Y.; Nam, A.-R.; Moon, E.-H.; Pyun, J.-H.; Park, J.; Kang, J.-S.; Lee, Y.J.; Cho, J.-Y. Spatiotemporal expression of long noncoding RNA Moshe modulates heart cell lineage commitment. *RNA Biol.* **2021**, *18*, 640–654. [[CrossRef](#)]
137. Grote, P.; Wittler, L.; Hendrix, D.; Koch, F.; Währisch, S.; Beisaw, A.; Macura, K.; Bläss, G.; Kellis, M.; Werber, M.; et al. The Tissue-Specific lncRNA Fendrr Is an Essential Regulator of Heart and Body Wall Development in the Mouse. *Dev. Cell* **2013**, *24*, 206–214. [[CrossRef](#)]
138. Zhu, H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease. *Life Sci.* **2016**, *144*, 194–201. [[CrossRef](#)]
139. Watanabe, M.; Whitman, M. FAST-1 is a key maternal effector of mesoderm inducers in the early *Xenopus* embryo. *Development* **1999**, *126*, 5621–5634. [[CrossRef](#)]
140. Weisberg, E.; Winnier, G.E.; Chen, X.; Farnsworth, C.L.; Hogan, B.L.; Whitman, M. A mouse homologue of FAST-1 transduces TGF β superfamily signals and is expressed during early embryogenesis. *Mech. Dev.* **1998**, *79*, 17–27. [[CrossRef](#)]
141. von Both, I.; Silvestri, C.; Erdemir, T.; Lickert, H.; Walls, J.R.; Henkelman, R.M.; Rossant, J.; Harvey, R.P.; Attisano, L.; Wrana, J.L. Foxh1 is essential for development of the anterior heart field. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 331–345. [[CrossRef](#)]
142. Huang, C.-X.; Chen, N.; Wu, X.-J.; He, Y.; Huang, C.-H.; Liu, H.; Wang, W.-M.; Wang, H.-L. Zebrafish let-7b acts downstream of hypoxia-inducible factor-1 α to assist in hypoxia-mediated cell proliferation and cell cycle regulation. *Life Sci.* **2017**, *171*, 21–29. [[CrossRef](#)]
143. Heigwer, J.; Kutzner, J.; Haeussler, M.; Burkhalter, M.D.; Draebing, T.; Juergensen, L.; Katus, H.A.; Philipp, M.; Westhoff, J.H.; Hassel, D. miR-103/107 regulates left-right asymmetry in zebrafish by modulating Kupffer’s vesicle development and ciliogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *527*, 432–439. [[CrossRef](#)]
144. Fischer, P.; Chen, H.; Pacho, F.; Rieder, D.; Kimmel, R.A.; Meyer, D. FoxH1 represses miR-430 during early embryonic development of zebrafish via non-canonical regulation. *BMC Biol.* **2019**, *17*, 61. [[CrossRef](#)]
145. Liu, Y.; Zhang, L.; Meng, Y.; Huang, L. Benzyl isothiocyanate inhibits breast cancer cell tumorigenesis via repression of the FoxH1-Mediated Wnt/ β -catenin pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 17601–17611.
146. Vincent, S.D.; Buckingham, M. Chapter One—How to Make a Heart: The Origin and Regulation of Cardiac Progenitor Cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2010**, *90*, 1–41.
147. Evans, S.M.; Yelon, D.; Conlon, F.L.; Kirby, M.L. Myocardial Lineage Development. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1428–1444. [[CrossRef](#)]
148. Ren, J.; Miao, D.; Li, Y.; Gao, R. Spotlight on Isl1: A Key Player in Cardiovascular Development and Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 793605. [[CrossRef](#)]
149. Wang, J.; Greene, S.B.; Bonilla-Claudio, M.; Tao, Y.; Zhang, J.; Huang, Z.; Black, B.L.; Wang, F.; Martin, J.F. Bmp-signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a micro RNA-mediated mechanism. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 903–912. [[CrossRef](#)]
150. Zlabinger, K.; Spannbauer, A.; Traxler, D.; Gugerell, A.; Lukovic, D.; Winkler, J.; Mester-Tonczar, J.; Podesser, B.; Gyöngyösi, M. MiR-21, MiR-29a, GATA4, and MEF2c Expression Changes in Endothelin-1 and Angiotensin II Cardiac Hypertrophy Stimulated Isl-1⁺Sca-1⁺c-kit⁺ Porcine Cardiac Progenitor Cells In Vitro. *Cells* **2019**, *8*, 1416. [[CrossRef](#)]
151. Wang, X.; Zhang, X.; Li, F.; Ji, Q. MiR-128-3p accelerates cardiovascular calcification and insulin resistance through ISL1-dependent Wnt pathway in type 2 diabetes mellitus rats. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 4997–5010. [[CrossRef](#)]
152. Steimle, J.D.; Moskowitz, I.P. Chapter Seven—TBX5: A Key Regulator of Heart Development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *122*, 195–221.
153. D’Aurizio, R.; Russo, F.; Chiavacci, E.; Baumgart, M.; Groth, M.; D’Onofrio, M.; Arisi, I.; Rainaldi, G.; Pitto, L.; Pellegrini, M. Discovering miRNA Regulatory Networks in Holt–Oram Syndrome Using a Zebrafish Model. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 60. [[CrossRef](#)]
154. Chiavacci, E.; Daurizio, R.; Guzzolino, E.; Russo, F.; Baumgart, M.; Groth, M.; Mariani, L.; D’Onofrio, M.; Arisi, I.; Pellegrini, M.; et al. MicroRNA 19a replacement partially res-cues fin and cardiac defects in zebrafish model of Holt Oram syndrome. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18240. [[CrossRef](#)]
155. Boon, R.A.; Iekushi, K.; Lechner, S.; Seeger, T.; Fischer, A.; Heydt, S.; Kaluza, D.; Tréguer, K.; Carmona, G.; Bonauer, A.; et al. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature* **2013**, *495*, 107–110. [[CrossRef](#)]
156. Fish, J.E.; Wythe, J.D.; Xiao, T.; Bruneau, B.G.; Stainier, D.Y.R.; Srivastava, D.; Woo, S. A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish. *Development* **2011**, *138*, 1409–1419. [[CrossRef](#)]
157. Qu, X.; Jia, H.; Garrity, D.M.; Tompkins, K.; Batts, L.; Appel, B.; Zhong, T.P.; Baldwin, H.S. ndrg4 is required for normal myocyte proliferation during early cardiac development in zebrafish. *Dev. Biol.* **2008**, *317*, 486–496. [[CrossRef](#)]
158. Chiavacci, E.; Dolfi, L.; Verduci, L.; Meghini, F.; Gestri, G.; Evangelista, M.; Wilson, S.W.; Cremisi, F.; Pitto, L. MicroRNA 218 Mediates the Effects of Tbx5a Over-Expression on Zebrafish Heart Development. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50536. [[CrossRef](#)]

159. Alzein, M.; Lozano-Velasco, E.; Hernández-Torres, F.; García-Padilla, C.; Domínguez, J.N.; Aránega, A.; Franco, D. Differential Spatio-Temporal Regulation of T-Box Gene Expression by microRNAs during Cardiac Development. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2021**, *8*, 56. [[CrossRef](#)]
160. Ma, J.; Chen, S.; Hao, L.; Sheng, W.; Chen, W.; Ma, X.; Zhang, B.; Ma, D.; Huang, G. Hypermethylation-mediated down-regulation of lncRNA TBX5-AS1:2 in Tetralogy of Fallot inhibits cell proliferation by reducing TBX5 expression. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 6472–6484. [[CrossRef](#)]
161. Hori, Y.; Tanimoto, Y.; Takahashi, S.; Furukawa, T.; Koshiba-Takeuchi, K.; Takeuchi, J.K. Important cardiac transcription factor genes are accompanied by bidirectional long non-coding RNAs. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Yang, X.H.; Nadadur, R.D.; Hilvering, C.; Bianchi, V.; Werner, M.; Mazurek, S.R.; Gadek, M.; Shen, K.M.; Goldman, J.A.; Tyan, L.; et al. Transcription-factor-dependent enhancer transcription defines a gene regulatory network for cardiac rhythm. *eLife* **2017**, *6*, e31683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Shiratori, H.; Hamada, H. TGF β signaling in establishing left–right asymmetry. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *32*, 80–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Hamada, H.; Meno, C.; Watanabe, D.; Saijoh, Y. Establishment of vertebrate left–right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 103–113. [[CrossRef](#)]
165. Franco, D. The Role of Pitx2 during Cardiac Development Linking Left–Right Signaling and Congenital Heart Diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* **2003**, *13*, 157–163. [[CrossRef](#)]
166. Grimes, D.T.; Burdine, R.D. Left–Right Patterning: Breaking Symmetry to Asymmetric Morphogenesis. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 616–628. [[CrossRef](#)]
167. Franco, D.; Sedmera, D.; Lozano-Velasco, E. Multiple Roles of Pitx2 in Cardiac Development and Disease. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2017**, *4*, 16. [[CrossRef](#)]
168. Franco, D.; Christoffels, V.M.; Campione, M. Homeobox transcription factor Pitx2: The rise of an asymmetry gene in cardiogenesis and arrhythmogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **2014**, *24*, 23–31. [[CrossRef](#)]
169. Gage, P.; Suh, H.; Camper, S. Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* **1999**, *126*, 4643–4651. [[CrossRef](#)]
170. Lu, M.-F.; Pressman, C.L.; Dyer, R.; Johnson, R.L.; Martin, J.F. Function of Rieger syndrome gene in left–right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **1999**, *401*, 276–278. [[CrossRef](#)]
171. Barroso-Deljesus, A.; Lucena-Aguilar, G.; Sanchez, L.; Ligerio, G.; Gutierrez-Aranda, I.; Menendez, P. The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. *FASEB J.* **2011**, *25*, 1497–1508. [[CrossRef](#)]
172. Rosa, A.; Spagnoli, F.M.; Brivanlou, A.H. The miR-430/427/302 Family Controls Mesendodermal Fate Specification via Species-Specific Target Selection. *Dev. Cell* **2009**, *16*, 517–527. [[CrossRef](#)]
173. Rosa, A.; Papaioannou, M.D.; Krzyspiak, J.E.; Brivanlou, A.H. miR-373 is regulated by TGF β signaling and promotes mesoderm differentiation in human Embryonic Stem Cells. *Dev. Biol.* **2014**, *391*, 81–88. [[CrossRef](#)]
174. Choi, W.-Y.; Giraldez, A.J.; Schier, A.F. Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science* **2007**, *318*, 271–274. [[CrossRef](#)]
175. Ma, H.; Lin, Y.; Zhao, Z.-A.; Lu, X.; Yu, Y.; Zhang, X.; Wang, Q.; Li, L. MicroRNA-127 Promotes Mesoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells by Targeting Left-Right Determination Factor 2. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 12126–12135. [[CrossRef](#)]
176. Yang, F.; Qi, J. miR-430a regulates the development of left–right asymmetry by targeting sqt in the teleost. *Gene* **2020**, *745*, 144628. [[CrossRef](#)]
177. Li, M.; Hu, X.; Zhu, J.; Zhu, C.; Zhu, S.; Liu, X.; Xu, J.; Han, S.; Yu, Z. Overexpression of miR-19b Impairs Cardiac Development in Zebrafish by Targeting cttnb1. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1988–2002. [[CrossRef](#)]
178. Ryan, A.K.; Blumberg, B.; Rodriguez-Esteban, C.; Yonei-Tamura, S.; Tamura, K.; Tsukui, T.; De La Peña, J.; Sabbagh, W.; Greenwald, J.; Choe, S.; et al. Pitx2 determines left–right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **1998**, *394*, 545–551. [[CrossRef](#)]
179. Piedra, M.E.; Icardo, J.M.; Albajar, M.; Rodriguez-Rey, J.C.; Ros, M.A. Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left–right asymmetry. *Cell* **1998**, *94*, 319–324. [[CrossRef](#)]
180. Logan, M.; Pagán-Westphal, S.M.; Smith, D.M.; Paganessi, L.; Tabin, C.J. The Transcription Factor Pitx2 Mediates Situs-Specific Morphogenesis in Response to Left-Right Asymmetric Signals. *Cell* **1998**, *94*, 307–317. [[CrossRef](#)]
181. Campione, M.; Steinbeisser, H.; Schweickert, A.; Deissler, K.; van Bebber, F.; Lowe, L.A.; Nowotschin, S.; Viebahn, C.; Haffter, P.; Kuehn, M.R.; et al. The homeobox gene Pitx2: Mediator of asymmetric left–right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **1999**, *126*, 1225–1234. [[CrossRef](#)]
182. Bisgrove, B.W.; Essner, J.J.; Yost, H.J. Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left–right asymmetry. *Development* **2000**, *127*, 3567–3579. [[CrossRef](#)]
183. Bisgrove, B.W.; Yost, H.J. Classification of left–right patterning defects in zebrafish, mice, and humans. *Am. J. Med Genet.* **2001**, *101*, 315–323. [[CrossRef](#)]
184. Branford, W.W.; Essner, J.; Yost, H. Regulation of Gut and Heart Left–Right Asymmetry by Context-Dependent Interactions between Xenopus Lefty and BMP4 Signaling. *Dev. Biol.* **2000**, *223*, 291–306. [[CrossRef](#)]
185. Chinchilla, A.; Daimi, H.; Lozano-Velasco, E.; Dominguez, J.N.; Caballero, R.; Delpo, E.; Tamargo, J.; Cinca, J.; Hove-Madsenet, L.; Aranega, A.E.; et al. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and structural remodeling linked to arrhythmogenesis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2011**, *4*, 269–279. [[CrossRef](#)]

186. Wang, J.; Klysiak, E.; Sood, S.; Johnson, R.L.; Wehrens, X.H.T.; Martin, J.F. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9753–9758. [[CrossRef](#)]
187. Kirchhof, P.; Kahr, P.C.; Kaese, S.; Piccini, I.; Vokshi, I.; Scheld, H.-H.; Rotering, H.; Fortmueller, L.; Laakmann, S.; Verheule, S.; et al. PITX2c Is Expressed in the Adult Left Atrium, and Reducing Pitx2c Expression Promotes Atrial Fibrillation Inducibility and Complex Changes in Gene Expression. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2011**, *4*, 123–133. [[CrossRef](#)]
188. Lozano-Velasco, E.; Hernández-Torres, F.; Daimi, H.; Serra, S.A.; Herraiz, A.; Hove-Madsen, L.; Aránega, A.; Franco, D. Pitx2 impairs calcium handling in a dose-dependent manner by modulating Wnt signalling. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *109*, 55–66. [[CrossRef](#)]
189. Lozano-Velasco, E.; Wangenstein, R.; Quesada, A.; Garcia-Padilla, C.; Osorio, J.A.; Ruiz-Torres, M.D.; Aranega, A.; Franco, D. Hyperthyroidism, but not hypertension, impairs PITX2 expression leading to Wnt-microRNA-ion channel remodeling. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188473. [[CrossRef](#)]
190. Franco, D.; Aranega, A.; Dominguez, J.N. Non-coding RNAs and Atrial Fibrillation. In *Non-coding RNAs in Cardiovascular Diseases*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; Volume 1229, pp. 311–325. [[CrossRef](#)]
191. Petkova, M.; Atkinson, A.J.; Yanni, C.; Stuart, L.; Aminu, A.J.; Ivanova, A.D.; Pustovit, K.B.; Geraghty, C.; Feather, A.; Li, N.; et al. Identification of Key Small Non-Coding MicroRNAs Controlling Pacemaker Mechanisms in the Human Sinus Node. *J. Am. Heart Assoc.* **2020**, *9*, e016590. [[CrossRef](#)]
192. Garcia-Padilla, C.; Aránega, A.; Franco, D. The role of long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *AIMS Genet.* **2018**, *5*, 124–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Ocaña, O.H.; Córcoles, R.; Fabra, Á.; Moreno-Bueno, G.; Acloque, H.; Vega, S.; Barrallo-Gimeno, A.; Cano, A.; Nieto, M.A. Metastatic Colonization Requires the Re-repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prx1. *Cancer Cell.* **2012**, *22*, 709–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Fazilaty, H.; Rago, L.; Youssef, K.K.; Ocaña, O.H.; Garcia-Asencio, F.; Arcas, A.; Galceran, J.; Nieto, M.A. A gene regulatory network to control EMT programs in development and disease. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Rago, L.; Castroviejo, N.; Fazilaty, H.; Garcia-Asencio, F.; Ocaña, O.H.; Galceran, J.; Nieto, M.A. MicroRNAs Establish the Right-Handed Dominance of the Heart Laterality Pathway in Vertebrates. *Dev. Cell* **2019**, *51*, 446–459. [[CrossRef](#)]
196. Welsh, I.C.; Kwak, H.; Chen, F.L.; Werner, M.; Shopland, L.S.; Danko, C.G.; Lis, J.T.; Zhang, M.; Martin, J.F.; Kurpios, N.A. Chromatin Architecture of the Pitx2 Locus Requires CTCF- and Pitx2-Dependent Asymmetry that Mirrors Embryonic Gut Laterality. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 337–349. [[CrossRef](#)]
197. Gore-Panter, S.R.; Hsu, J.; Barnard, J.; Moravec, C.S.; Van Wagoner, D.R.; Chung, M.K.; Smith, J.D. PANCR, the PITX2 Adjacent Noncoding RNA, Is Expressed in Human Left Atria and Regulates PITX2c Expression. *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* **2016**, *9*, e003197. [[CrossRef](#)]
198. Cao, Y.; Duca, S.; Cao, J. Epicardium in Heart Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *12*, a037192. [[CrossRef](#)]
199. Quijada, P.; Trembley, M.A.; Small, E.M. The Role of the Epicardium During Heart Development and Repair. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 377–394. [[CrossRef](#)]
200. Pomares, J.M.P.; De La Pompa, J.L. Signaling During Epicardium and Coronary Vessel Development. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 1429–1442. [[CrossRef](#)]
201. Dueñas, A.; Aranega, A.E.; Franco, D. More than Just a Simple Cardiac Envelope; Cellular Contributions of the Epicardium. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, 44. [[CrossRef](#)]
202. Sridurongrit, S.; Larsson, J.; Schwartz, R.; Ruiz-Lozano, P.; Kaartinen, V. Signaling via the Tgf- β type I receptor Alk5 in heart development. *Dev. Biol.* **2008**, *322*, 208–218. [[CrossRef](#)]
203. Azhar, M.; Schultz, J.E.J.; Grupp, I.; Dorn, G.W.; Meneton, P.; Molin, D.G.; Groot, A.C.G.-D.; Doetschman, T. Transforming growth factor beta in cardiovascular development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 391–407. [[CrossRef](#)]
204. Allison, P.; Espiritu, D.; Barnett, J.V.; Camenisch, T.D. Type III TGF β receptor and Src direct hyaluronan-mediated invasive cell motility. *Cell. Signal.* **2014**, *27*, 453–459. [[CrossRef](#)]
205. Austin, A.F.; Compton, L.A.; Love, J.D.; Brown, C.B.; Barnett, J.V. Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGF β . *Dev. Dyn.* **2008**, *237*, 366–376. [[CrossRef](#)]
206. Clark, C.R.; Robinson, J.Y.; Sanchez, N.S.; Townsend, T.A.; Arrieta, J.A.; Merryman, W.D.; Trykall, D.Z.; Olivey, H.E.; Hong, C.C.; Barnett, J.V. Common pathways regulate Type III TGF β receptor-dependent cell invasion in epicardial and endocardial cells. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 688–698. [[CrossRef](#)]
207. Bax, N.A.M.; Van Oorschot, A.A.M.; Maas, S.; Braun, J.; Van Tuyn, J.; De Vries, A.A.F.; Groot, A.C.G.-D.; Goumans, M.-J. In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGF β -signaling and WT1. *Basic Res. Cardiol.* **2011**, *106*, 829–847. [[CrossRef](#)]
208. Hill, C.R.; Sanchez, N.S.; Love, J.D.; Arrieta, J.A.; Hong, C.C.; Brown, C.B.; Austin, A.F.; Barnett, J.V. BMP2 signals loss of epithelial character in epicardial cells but requires the Type III TGF β receptor to promote invasion. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 1012–1022. [[CrossRef](#)]
209. Morabito, C.J.; Dettman, R.; Kattan, J.; Collier, J.M.; Bristow, J. Positive and Negative Regulation of Epicardial–Mesenchymal Transformation during Avian Heart Development. *Dev. Biol.* **2001**, *234*, 204–215. [[CrossRef](#)]
210. Sánchez, N.S.; Barnett, J.V. TGF β and BMP-2 regulate epicardial cell invasion via TGF β R3 activation of the Par6/Smurf1/RhoA pathway. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 539–548. [[CrossRef](#)]

211. Brønnum, H.; Andersen, D.C.; Schneider, M.; Sandberg, M.B.; Eskildsen, T.; Nielsen, S.B.; Kalluri, R.; Sheikh, S.P. miR-21 Promotes Fibrogenic Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Epicardial Mesothelial Cells Involving Programmed Cell Death 4 and Sprouty-1. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56280. [[CrossRef](#)]
212. Pontemuzzo, E.; Foglio, E.; Vernucci, E.; Magenta, A.; D'Agostino, M.; Sileno, S.; Astanina, E.; Bussolino, F.; Pellegrini, L.; Germani, A.; et al. miR-200c-3p Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Epicardial Mesothelial Cells by Targeting Epicardial Follistatin-Related Protein 1. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4971. [[CrossRef](#)]
213. Tandon, P.; Miteva, Y.V.; Kuchenbrod, L.M.; Cristea, I.M.; Conlon, F.L. Tcf21 regulates the specification and maturation of proepicardial cells. *Development* **2013**, *140*, 2409–2421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Hu, H.; Lin, S.; Wang, S.; Chen, X. The Role of Transcription Factor 21 in Epicardial Cell Differentiation and the Development of Coronary Heart Disease. *Front Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Seeger, T.; Xu, Q.-F.; Muhly-Reinholz, M.; Fischer, A.; Kremp, E.-M.; Zeiher, A.M.; Dimmeler, S. Inhibition of let-7 augments the recruitment of epicardial cells and improves cardiac function after myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *94*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Smith, A.M.; Dykeman, C.A.; King, B.L.; Yin, V.P. Modulation of TNF α Activity by the microRNA Let-7 Coordinates Zebrafish Heart Regeneration. *iScience* **2019**, *15*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Miller, C.L.; Haas, U.; Diaz, R.; Leeper, N.J.; Kundu, R.K.; Patlolla, B.; Assimes, T.L.; Kaiser, F.J.; Perisic, L.; Hedin, U.; et al. Coronary Heart Disease-Associated Variation in TCF21 Disrupts a miR-224 Binding Site and miRNA-Mediated Regulation. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Yang, L.; Gao, X.; Luo, H.; Huang, Q.; Su, D.; Tan, X.; Lu, C. TCF21 rs12190287 Polymorphisms Are Associated with Ventricular Septal Defects in a Chinese Population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2017**, *21*, 312–315. [[CrossRef](#)]
219. Dechamethakun, S.; Ikeda, S.; Arai, T.; Sato, N.; Sawabe, M.; Muramatsu, M. Associations between the CDKN2A/B, ADTRP and PDGFD Polymorphisms and the Development of Coronary Atherosclerosis in Japanese Patients. *J. Atheroscler. Thromb.* **2014**, *21*, 680–690. [[CrossRef](#)]
220. Fujimaki, T.; Oguri, M.; Horibe, H.; Kato, K.; Matsuo, R.; Abe, S.; Tokoro, F.; Arai, M.; Noda, T.; Watanabe, S.; et al. Association of a transcription factor 21 gene polymorphism with hypertension. *Biomed. Rep.* **2015**, *3*, 118–122. [[CrossRef](#)]
221. Wirtwein, M.; Melander, O.; Sjögren, M.; Hoffmann, M.; Narkiewicz, K.; Gruchala, M.; Sobiczewski, W. Relationship between selected DNA polymorphisms and coronary artery disease complications. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *228*, 814–820. [[CrossRef](#)]
222. Zhao, Q.; Wirka, R.; Nguyen, T.; Nagao, M.; Cheng, P.; Miller, C.L.; Kim, J.B.; Pjanic, M.; Quertermous, T. TCF21 and AP-1 interact through epigenetic modifications to regulate coronary artery disease gene expression. *Genome Med.* **2019**, *11*, 23. [[CrossRef](#)]
223. Nagao, M.; Lyu, Q.; Zhao, Q.; Wirka, R.C.; Bagga, J.; Nguyen, T.; Cheng, P.; Kim, J.; Pjanic, M.; Miano, J.M.; et al. Coronary Disease-Associated Gene TCF21 Inhibits Smooth Muscle Cell Differentiation by Blocking the Myocardin-Serum Response Factor Pathway. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 517–529. [[CrossRef](#)]
224. Bastami, M.; Ghaderian, S.M.; Omrani, M.D.; Mirfakhraie, R.; Vakili, H.; Parsa, S.A.; Nariman-Saleh-Fam, Z.; Masotti, A. MiRNA-Related Polymorphisms in miR-146a and TCF21 Are Associated with Increased Susceptibility to Coronary Artery Disease in an Iranian Population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2016**, *20*, 241–248. [[CrossRef](#)]
225. Aminu, A.J.; Petkova, M.; Chen, W.; Yin, Z.; Kuzmin, V.S.; Atkinson, A.J.; Dobrzynski, H. MiR-486-3p and MiR-938—Important Inhibitors of Pacemaking Ion Channels and/or Markers of Immune Cells. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 11366. [[CrossRef](#)]
226. Yanni, J.; D'Souza, A.; Wang, Y.; Li, N.; Hansen, B.J.; Zakharkin, S.O.; Smith, M.; Hayward, C.; Whitson, B.A.; Mohler, P.J.; et al. Silencing miR-370-3p rescues funny current and sinus node function in heart failure. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11279. [[CrossRef](#)]
227. Carmona, R.; Guadix, J.A.; Cano, E.; Ruiz-Villalba, A.; Portillo-Sánchez, V.; Pérez-Pomares, J.M.; Muñoz-Chápuli, R. The embryonic epicardium: An essential element of cardiac development. *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, *14*, 2066–2072. [[CrossRef](#)]
228. Martínez-Estrada, O.M.; Lettice, A.L.; Essafi, A.; Guadix, J.A.; Slight, J.; Vevelcel, V.; Hall, E.; Reichmann, J.; Devenney, P.S.; Hohenstein, P.; et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat. Genet.* **2009**, *42*, 89–93. [[CrossRef](#)]
229. von Gise, A.; Zhou, B.; Honor, L.B.; Ma, Q.; Petryk, A.; Pu, W.T. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev. Biol.* **2011**, *356*, 421–431. [[CrossRef](#)]
230. Bakker, M.L.; Christoffels, V.M.; Moorman, A.F.M. The Cardiac Pacemaker and Conduction System Develops From Embryonic Myocardium that Retains Its Primitive Phenotype. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2010**, *56*, 6–15. [[CrossRef](#)]
231. Lv, L.; Chen, G.; Zhou, J.; Li, J.; Gong, J. WT1-AS promotes cell apoptosis in hepatocellular carcinoma through down-regulating of WT1. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2015**, *34*, 119. [[CrossRef](#)]
232. Zhang, Y.; Na, R.; Wang, X. LncRNA WT1-AS up-regulates p53 to inhibit the proliferation of cervical squamous carcinoma cells. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1052. [[CrossRef](#)]
233. Wang, Q.; Ge, X.; Zhang, J.; Chen, L. Effect of lncRNA WT1-AS regulating WT1 on oxidative stress injury and apoptosis of neurons in Alzheimer's disease via inhibition of the miR-375/SIX4 axis. *Aging* **2020**, *12*, 23974–23995. [[CrossRef](#)]
234. Christoffels, V.M.; Smits, G.J.; Kispert, A.; Moorman, A.F.M. Development of the Pacemaker Tissues of the Heart. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 240–254. [[CrossRef](#)]
235. Hoogaars, W.M.H.; Barnett, P.; Moorman, A.F.M.; Christoffels, V.M. Cardiovascular development: Towards biomedical applicability. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 646. [[CrossRef](#)]

236. Singh, R.; Hoogaars, W.M.; Barnett, P.; Grieskamp, T.; Rana, M.S.; Buermans, H.; Farin, H.F.; Petry, M.; Heallen, T.; Martin, J.F.; et al. Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 1377–1389. [[CrossRef](#)]
237. Wang, J.; Bai, Y.; Li, N.; Ye, W.; Zhang, M.; Greene, S.B.; Tao, Y.; Chen, Y.; Wehrens, X.H.; Martin, J.F. Pitx2-microRNA pathway that delimits sinoatrial node development and inhibits predisposition to atrial fibrillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9181–9186. [[CrossRef](#)]
238. Benzoni, P.; Nava, L.; Giannetti, F.; Guerini, G.; Gualdoni, A.; Bazzini, C.; Milanesi, R.; Bucchi, A.; Baruscotti, M.; Barbuti, A. Dual role of miR-1 in the development and function of sinoatrial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2021**, *157*, 104–112. [[CrossRef](#)]
239. D'Souza, A.; Bucchi, A.; Johnsen, A.B.; Logantha, S.J.; Monfredi, O.; Yanni, J.; Prehar, S.; Hart, G.; Cartwright, E.; Wisløff, U.; et al. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3775. [[CrossRef](#)]
240. Zhao, H.; Wang, F.; Zhang, W.; Yang, M.; Tang, Y.; Wang, X.; Zhao, Q.; Huang, C. Overexpression of TBX3 in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) increases their differentiation into cardiac pacemaker-like cells. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *130*, 110612. [[CrossRef](#)]
241. Jiang, K.; Ren, C.; Nair, V. MicroRNA-137 represses Klf4 and Tbx3 during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **2013**, *11*, 1299–1313. [[CrossRef](#)]
242. Han, J.; Yuan, P.; Yang, H.; Zhang, J.; Soh, B.S.; Li, P.; Lim, S.L.; Cao, S.; Tay, J.; Orlov, Y.; et al. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature* **2010**, *463*, 1096–1100. [[CrossRef](#)]
243. Russell, R.; Ilg, M.; Lin, Q.; Wu, G.; Lechel, A.; Bergmann, W.; Eiseler, T.; Linta, L.; Kumar, P.P.; Klingenstein, M.; et al. A Dynamic Role of TBX3 in the Pluripotency Circuitry. *Stem Cell Rep.* **2015**, *5*, 1155–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Niwa, H.; Ogawa, K.; Shimosato, D.; Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **2009**, *460*, 118–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
245. Li, W.; Liu, M.; Zhao, C.; Chen, C.; Kong, Q.; Cai, Z.; Li, D. MiR-1/133 attenuates cardiomyocyte apoptosis and electrical remodeling in mice with viral myocarditis. *Cardiol. J.* **2020**, *27*, 285–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
246. Li, Y.; Zhang, J.; Huo, C.; Ding, N.; Li, J.; Xiao, J.; Lin, X.; Cai, B.; Zhang, Y.; Xu, J. Dynamic Organization of lncRNA and Circular RNA Regulators Collectively Controlled Cardiac Differentiation in Humans. *EBioMedicine* **2017**, *24*, 137–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
247. Salguero-Jiménez, A.; Grego-Bessa, J.; D'Amato, G.; Jiménez-Borreguero, L.J.; De La Pompa, J.L. Myocardial Notch1-Rbpj deletion does not affect NOTCH signaling, heart development or function. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203100. [[CrossRef](#)]
248. MacGrogan, D.; Münch, J.; De La Pompa, J.L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* **2018**, *15*, 685–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
249. Luxán, G.; D'Amato, G.; MacGrogan, D.; De La Pompa, J.L. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Circ. Res.* **2016**, *118*, e1–e18. [[CrossRef](#)]
250. Gassmann, M.; Casagrande, F.; Orioli, D.; Simon, H.; Lai, C.; Klein, R.; Lemke, G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **1995**, *378*, 390–394. [[CrossRef](#)]
251. Lee, K.-F.; Simon, H.; Chen, H.; Bates, B.; Hung, M.-C.; Hauser, C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **1995**, *378*, 394–398. [[CrossRef](#)]
252. Rupert, C.; Coulombe, K.L. The Roles of Neuregulin-1 in Cardiac Development, Homeostasis, and Disease. *Biomark. Insights* **2015**, *10s1*, BMI-S20061. [[CrossRef](#)]
253. Kirabo, A.; Ryzhov, S.; Gupte, M.; Sengsayadeth, S.; Gumina, R.J.; Sawyer, D.B.; Galindo, C.L. Neuregulin-1 β induces proliferation, survival and paracrine signaling in normal human cardiac ventricular fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *105*, 59–69. [[CrossRef](#)]
254. Sun, M.; Yan, X.; Bian, Y.; Caggiano, A.O.; Morgan, J.P. Improving murine embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes with neuregulin-1: Differential expression of microRNA. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2011**, *301*, C21–C30. [[CrossRef](#)]
255. von Gise, A.; Lin, Z.; Schlegelmilch, K.; Honor, L.B.; Pan, G.M.; Buck, J.N.; Ma, Q.; Ishiwata, T.; Zhou, B.; Camargo, F.D.; et al. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 2394–2399. [[CrossRef](#)]
256. Xiao, Y.; Leach, J.; Wang, J.; Martin, J.F. Hippo/Yap Signaling in Cardiac Development and Regeneration. *Curr. Treat. Opt. Cardiovasc. Med.* **2016**, *18*, 38. [[CrossRef](#)]
257. Moya, I.M.; Halder, G. Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *20*, 211–226. [[CrossRef](#)]
258. Mia, M.M.; Singh, M.K. The Hippo Signaling Pathway in Cardiac Development and Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 211. [[CrossRef](#)]
259. Xie, Y.; Wang, Q.; Gao, N.; Wu, F.; Lan, F.; Zhang, F.; Jin, L.; Huang, Z.; Ge, J.; Wang, H.; et al. MicroRNA-10b Promotes Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Proliferation via Novel Target Gene LATS1. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *19*, 437–445. [[CrossRef](#)]
260. Wu, K.-H.; Xiao, Q.-R.; Yang, Y.; Xu, J.-L.; Zhang, F.; Liu, C.-M.; Zhang, Z.-M.; Lu, Y.-Q.; Huang, N.-P. MicroRNA-34a modulates the Notch signaling pathway in mice with congenital heart disease and its role in heart development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *114*, 300–308. [[CrossRef](#)]
261. Han, C.; Song, Y.; Lian, C. MiR-769 Inhibits Colorectal Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting HEY1. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 9232–9239. [[CrossRef](#)]

262. Wei, B.; Liu, Y.; Guan, H. MicroRNA-145-5p attenuates high glucose-induced apoptosis by targeting the Notch signaling pathway in podocytes. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1915–1924. [[CrossRef](#)]
263. Lina, S.; Lihong, Q.; Di, Y.; Bo, Y.; Xiaolin, L.; Jing, M. microRNA-146a and Hey2 form a mutual negative feedback loop to regulate the inflammatory response in chronic apical periodontitis. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *120*, 645–657. [[CrossRef](#)]
264. Wu, D.-C.; Zhang, M.-F.; Su, S.-G.; Fang, H.-Y.; Wang, X.-H.; He, D.; Xie, Y.-Y.; Liu, X.-H. HEY2, a target of miR-137, indicates poor outcomes and promotes cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 38052–38063. [[CrossRef](#)]
265. Bao, Y.; Lu, Y.; Feng, W.; Yu, H.; Tao, Y.; Shi, Q.; Chen, W.; Wang, X. COUP-TFII promotes epithelial-mesenchymal transition by inhibiting miR-34a expression in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 1337–1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
266. Jeong, B.-C.; Kang, I.-H.; Hwang, Y.-C.; Kim, S.-H.; Koh, J.-T. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
267. Kang, I.-H.; Jeong, B.-C.; Hur, S.-W.; Choi, H.; Choi, S.-H.; Ryu, J.-H.; Hwang, Y.-C.; Koh, J.-T. MicroRNA-302a Stimulates Osteoblastic Differentiation by Repressing COUP-TFII Expression. *J. Cell. Physiol.* **2014**, *230*, 911–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
268. Lu, F.; Langenbacher, A.; Chen, J.-N. Tbx20 drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish. *Dev. Biol.* **2016**, *421*, 139–148. [[CrossRef](#)]
269. Gupta, M.K.; Rao, T.N. Hearty miR-363 controls HAND1 in cardiac cell specification. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 89. [[CrossRef](#)]
270. Wagh, V.; Pomorski, A.; Wilschut, K.J.; Piombo, S.; Bernstein, H.S. MicroRNA-363 negatively regulates the left ventricular determining transcription factor HAND1 in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *5*, 75. [[CrossRef](#)]
271. Cao, L.; Kong, L.-P.; Yu, Z.-B.; Han, S.-P.; Bai, Y.-F.; Zhu, J.; Hu, X.; Zhu, C.; Zhu, S.; Guo, X.-R. microRNA expression profiling of the developing mouse heart. *Int. J. Mol. Med.* **2012**, *30*, 1095–1104. [[CrossRef](#)]
272. Zhao, Y.; Samal, E.; Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **2005**, *436*, 214–220. [[CrossRef](#)]
273. Vo, N.K.; Dalton, R.P.; Liu, N.; Olson, E.N.; Goodman, R.H. Affinity purification of microRNA-133a with the cardiac transcription factor, Hand2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19231–19236. [[CrossRef](#)]
274. Liu, L.; Yuan, Y.; He, X.; Xia, X.; Mo, X. MicroRNA-1 upregulation promotes myocardiocyte proliferation and suppresses apoptosis during heart development. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 2837–2842. [[CrossRef](#)]
275. Lavallée, G.; Andelfinger, G.; Nadeau, M.; Lefebvre, C.; Nemer, G.; Horb, M.E.; Nemer, M. The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J.* **2006**, *25*, 5201–5213. [[CrossRef](#)]
276. Gu, M.; Wang, J.; Wang, Y.; Xu, Y.; Zhang, Y.; Wu, W.; Liao, S. MiR-147b inhibits cell viability and promotes apoptosis of rat H9c2 cardiomyocytes via down-regulating KLF13 expression. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2018**, *50*, 288–297. [[CrossRef](#)]
277. Bayoumi, A.S.; Park, K.-M.; Wang, Y.; Teoh, J.-P.; Aonuma, T.; Tang, Y.; Su, H.; Weintraub, N.L.; Kim, I.-M. A carvedilol-responsive microRNA, miR-125b-5p protects the heart from acute myocardial infarction by repressing pro-apoptotic bak1 and klf13 in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *114*, 72–82. [[CrossRef](#)]
278. Mikhailov, A.T.; Torrado, M. Myocardial transcription factors in diastolic dysfunction: Clues for model systems and disease. *Heart Fail. Rev.* **2016**, *21*, 783–794. [[CrossRef](#)]
279. Kong, L.; Hu, N.; Du, X.; Wang, W.; Chen, H.; Li, W.; Wei, S.; Zhuang, H.; Li, X.; Li, C. Upregulation of miR-483-3p contributes to endothelial progenitor cells dysfunction in deep vein thrombosis patients via SRF. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 23. [[CrossRef](#)]
280. Xu, D.; Guo, Y.; Liu, T.; Li, S.; Sun, Y. miR-22 contributes to endosulfan-induced endothelial dysfunction by targeting SRF in HUVECs. *Toxicol. Lett.* **2017**, *269*, 33–40. [[CrossRef](#)]
281. You, G.; Zu, B.; Wang, B.; Fu, Q.; Li, F. Identification of miRNA-mRNA-TFs Regulatory Network and Crucial Pathways Involved in Tetralogy of Fallot. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 552. [[CrossRef](#)]
282. Wei, X.; Hou, X.; Li, J.; Liu, Y. miRNA-181a/b Regulates Phenotypes of Vessel Smooth Muscle Cells Through Serum Response Factor. *DNA Cell Biol.* **2017**, *36*, 127–135. [[CrossRef](#)]
283. Bolte, C.; Zhang, Y.; Wang, I.-C.; Kalin, T.V.; Molkentin, J.D.; Kalinichenko, V.V. Expression of Foxm1 Transcription Factor in Cardiomyocytes Is Required for Myocardial Development. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22217. [[CrossRef](#)]
284. Chen, F.; Kook, H.; Milewski, R.; Gitler, A.D.; Lu, M.M.; Li, J.; Nazarian, R.; Schnepf, R.; Jen, K.-Y.; Biben, C.; et al. Hop Is an Unusual Homeobox Gene that Modulates Cardiac Development. *Cell* **2002**, *110*, 713–723. [[CrossRef](#)]
285. Hadji, F.; Boulanger, M.-C.; Guay, S.-P.; Gaudreault, N.; Amellah, S.; Mkannez, G.; Bouchareb, R.; Marchand, J.T.; Nsaibia, M.J.; Guauque-Olarte, S.; et al. Altered DNA Methylation of Long Noncoding RNA H19 in Calcific Aortic Valve Disease Promotes Mineralization by Silencing NOTCH1. *Circulation* **2016**, *134*, 1848–1862. [[CrossRef](#)]
286. Anderson, K.M.; Anderson, D.M.; McAnally, J.R.; Shelton, J.M.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. Transcription of the non-coding RNA upperhand controls Hand2 expression and heart development. *Nature* **2016**, *539*, 433–436. [[CrossRef](#)]
287. Han, X.; Zhang, J.; Liu, Y.; Fan, X.; Ai, S.; Luo, Y.; Li, X.; Jin, H.; Luo, S.; Zheng, H.; et al. The lncRNA Hand2os1/Uph locus orchestrates heart development through regulation of precise expression of Hand2. *Development* **2019**, *146*, dev176198. [[CrossRef](#)]
288. Anderson, D.M.; Anderson, K.M.; Nelson, B.R.; McAnally, J.R.; Bezprozvannaya, S.; Shelton, J.M.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. A myocardium-adjacent lncRNA balances SRF-dependent gene transcription in the heart. *Genes Dev.* **2021**, *35*, 835–840. [[CrossRef](#)]
289. Zhao, J.; Zhang, W.; Lin, M.; Wu, W.; Jiang, P.; Tou, E.; Xue, M.; Richards, A.; Jour'd'Heuil, D.; Asif, A.; et al. MYOSLID Is a Novel Serum Response Factor-Dependent Long Noncoding RNA That Amplifies the Vascular Smooth Muscle Differentiation Program. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2016**, *36*, 2088–2099. [[CrossRef](#)]

290. Liu, J.; Li, Y.; Lin, B.; Sheng, Y.; Yang, L. HBL1 Is a Human Long Noncoding RNA that Modulates Cardiomyocyte Development from Pluripotent Stem Cells by Counteracting MIR1. *Dev. Cell* **2017**, *42*, 333–348.e5. [[CrossRef](#)]
291. Xiao, X.; Zhou, T.; Guo, S.; Guo, C.; Zhang, Q.; Dong, N.; Wang, Y. LncRNA MALAT1 sponges miR-204 to promote osteoblast differentiation of human aortic valve interstitial cells through up-regulating Smad4. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *243*, 404–412. [[CrossRef](#)]
292. Leisegang, M.S.; Bibli, S.-I.; Günther, S.; Pflüger-Müller, B.; Oo, J.A.; Höper, C.; Seredinski, S.; Yekelchik, M.; Schmitz-Rixen, T.; Schürmann, C.; et al. Pleiotropic effects of laminar flow and statins depend on the Krüppel-like factor-induced lncRNA MANTIS. *Eur. Heart J.* **2019**, *40*, 2523–2533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
293. Shyu, K.; Wang, B.; Fang, W.; Pan, C.; Lin, C. Hyperbaric oxygen-induced long non-coding RNA MALAT1 exosomes suppress MicroRNA-92a expression in a rat model of acute myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 12945–12954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
294. Bai, Y.; Wang, J.; Morikawa, Y.; Bonilla-Claudio, M.; Klysik, E.; Martin, J.F. Bmp signaling represses Vegfa to promote outflow tract cushion development. *Development* **2013**, *140*, 3395–3402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
295. Stottmann, R.W.; Choi, M.; Mishina, Y.; Meyers, E.N.; Klingensmith, J. BMP receptor IA is required in mammalian neural crest cells for development of the cardiac outflow tract and ventricular myocardium. *Development* **2004**, *131*, 2205–2218. [[CrossRef](#)]
296. Cai, C.-L.; Liang, X.; Shi, Y.; Chu, P.-H.; Pfaff, S.L.; Chen, J.; Evans, S. Isl1 Identifies a Cardiac Progenitor Population that Proliferates Prior to Differentiation and Contributes a Majority of Cells to the Heart. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 877–889. [[CrossRef](#)]
297. Engleka, K.A.; Manderfield, L.J.; Brust, R.D.; Li, L.; Cohen, A.; Dymecki, S.M.; Epstein, J.A. Islet1 Derivatives in the Heart Are of Both Neural Crest and Second Heart Field Origin. *Circ. Res.* **2012**, *110*, 922–926. [[CrossRef](#)]
298. Liu, W.; Selever, J.; Wang, D.; Lu, M.-F.; Moses, K.A.; Schwartz, R.J.; Martin, J.F. Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4489–4494. [[CrossRef](#)]
299. Solloway, M.J.; Robertson, E.J. Early embryonic lethality in Bmp5; Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* **1999**, *126*, 1753–1768. [[CrossRef](#)]
300. Dobaczewski, M.; Chen, W.; Frangogiannis, N.G. Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *51*, 600–606. [[CrossRef](#)]
301. Hurlstone, A.; Haramis, A.-P.G.; Wienholds, E.; Begthel, H.; Korving, J.; Van Eeden, F.; Cuppen, E.; Zivkovic, D.; Plasterk, R.H.A.; Clevers, H. The Wnt/ β -catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature* **2003**, *425*, 633–637. [[CrossRef](#)]
302. Jarrett, M.J.; Houk, A.K.; McCuiston, P.E.; Weyant, M.J.; Reece, T.B.; Meng, X.; Fullerton, D.A. Wnt Signaling Mediates Pro-Fibrogenic Activity in Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Ann. Thorac. Surg.* **2021**, *112*, 519–525. [[CrossRef](#)]
303. Cai, X.; Zhang, W.; Hu, J.; Zhang, L.; Sultana, N.; Wu, B.; Cai, W.; Zhou, B.; Cai, C.-L. Tbx20 acts upstream of Wnt signaling to regulate endocardial cushion formation and valve remodeling during mouse cardiogenesis. *Development* **2013**, *140*, 3176–3187. [[CrossRef](#)]
304. Kim, Y.-S.; Kim, M.-J.; Koo, T.-H.; Kim, J.-D.; Koun, S.; Ham, H.J.; Lee, Y.M.; Rhee, M.; Yeo, S.-Y.; Huh, T.-L. Histone deacetylase is required for the activation of Wnt/ β -catenin signaling crucial for heart valve formation in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *423*, 140–146. [[CrossRef](#)]
305. Alfieri, C.M.; Cheek, J.; Chakraborty, S.; Yutzey, K.E. Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. *Dev. Biol.* **2010**, *338*, 127–135. [[CrossRef](#)]
306. Verhoeven, M.C.; Haase, C.; Christoffels, V.M.; Weidinger, G.; Bakkers, J. Wnt signaling regulates atrioventricular canal formation upstream of BMP and Tbx2. *Birth Defects Res. Part A: Clin. Mol. Teratol.* **2011**, *91*, 435–440. [[CrossRef](#)]
307. Bosada, F.M.; Devasthali, V.; Jones, K.A.; Stankunas, K. Wnt/ β -catenin signaling enables developmental transitions during valvulogenesis. *Development* **2016**, *143*, 1041–1054. [[CrossRef](#)]
308. Fang, M.; Wang, C.; Zheng, C.; Luo, J.; Hou, S.; Liu, K.; Li, X. Mir-29b promotes human aortic valve interstitial cell calcification via inhibiting TGF- β 3 through activation of wnt3/ β -catenin/Smad3 signaling. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *119*, 5175–5185. [[CrossRef](#)]
309. Chen, H.; Zhang, Z.; Zhang, L.; Wang, J.; Zhang, M.; Zhu, B. miR-27a protects human mitral valve interstitial cell from TNF- α -induced inflammatory injury via up-regulation of NELL-1. *Braz. J. Med Biol. Res.* **2018**, *51*. [[CrossRef](#)]
310. Lv, X.; Li, J.; Hu, Y.; Wang, S.; Yang, C.; Li, C.; Zhong, G. Overexpression of miR-27b-3p Targeting Wnt3a Regulates the Signaling Pathway of Wnt/ β -Catenin and Attenuates Atrial Fibrosis in Rats with Atrial Fibrillation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–13. [[CrossRef](#)]
311. Yang, M.; Kong, D.; Chen, J. Inhibition of miR-148b ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 17757–17766. [[CrossRef](#)]
312. Nakajima, Y.; Miyazono, K.; Kato, M.; Takase, M.; Yamagishi, T.; Nakamura, H. Extracellular Fibrillar Structure of Latent TGF β Binding Protein-1: Role in TGF β -dependent Endothelial-Mesenchymal Transformation during Endocardial Cushion Tissue Formation in Mouse Embryonic Heart. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 193–204. [[CrossRef](#)]
313. Brown, C.B.; Boyer, A.S.; Runyan, R.B.; Barnett, J.V. Requirement of Type III TGF- β Receptor for Endocardial Cell Transformation in the Heart. *Science* **1999**, *283*, 2080–2082. [[CrossRef](#)]
314. Todorovic, V.; Finnegan, E.; Freyer, L.; Zilberberg, L.; Ota, M.; Rifkin, D.B. Long form of latent TGF- β binding protein 1 (Ltbp1L) regulates cardiac valve development. *Dev. Dyn.* **2010**, *240*, 176–187. [[CrossRef](#)]
315. Ten Dijke, P.; Egorova, A.D.; Goumans, M.-J.T.H.; Poelmann, R.E.; Hierck, B.P. TGF- β Signaling in Endothelial-to-Mesenchymal Transition: The Role of Shear Stress and Primary Cilia. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, pt2. [[CrossRef](#)]

316. Wang, J.; Sridurongrit, S.; Dudas, M.; Thomas, P.; Nagy, A.; Schneider, M.; Epstein, J.A.; Kaartinen, V. Atrioventricular cushion transformation is mediated by ALK2 in the developing mouse heart. *Dev. Biol.* **2005**, *286*, 299–310. [[CrossRef](#)]
317. Ramsdell, A.F.; Markwald, R.R. Induction of Endocardial Cushion Tissue in the Avian Heart is Regulated, in Part, by TGF β -3-Mediated Autocrine Signaling. *Dev. Biol.* **1997**, *188*, 64–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
318. Townsend, T.A.; Robinson, J.Y.; How, T.; DeLaughter, D.M.; Blobe, G.C.; Barnett, J.V. Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGF β receptor interaction with GIPC. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 247–256. [[CrossRef](#)]
319. Lagendijk, A.K.; Goumans, M.J.; Burkhard, S.B.; Bakkers, J. MicroRNA-23 Restricts Cardiac Valve Formation by Inhibiting Has2 and Extracellular Hyaluronic Acid Production. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 649–657. [[CrossRef](#)]
320. Bonet, F.; Dueñas, A.; López-Sánchez, C.; García-Martínez, V.; Aránega, A.E.; Franco, D. MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation. *Dev. Dyn.* **2015**, *244*, 1259–1275. [[CrossRef](#)]
321. Koenig, S.N.; Bosse, K.; Majumdar, U.; Bonachea, E.M.; Radtke, F.; Garg, V. Endothelial Notch1 Is Required for Proper Development of the Semilunar Valves and Cardiac Outflow Tract. *J. Am. Heart Assoc.* **2016**, *5*, e003075. [[CrossRef](#)]
322. Yang, J.-H.; Wylie-Sears, J.; Bischoff, J. Opposing actions of Notch1 and VEGF in post-natal cardiac valve endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 512–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
323. Nigam, V.; Srivastava, D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, *47*, 828–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
324. Bosse, K.; Hans, C.P.; Zhao, N.; Koenig, S.N.; Huang, N.; Guggilam, A.; LaHaye, S.; Tao, G.; Lucchesi, P.A.; Lincoln, J.; et al. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *60*, 27–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
325. Timmerman, L.A.; Grego-Bessa, J.; Raya, A.; Bertrán, E.; Pérez-Pomares, J.M.; Díez, J.; Aranda, S.; Palomo, S.; McCormick, F.; Izpisua-Belmonte, J.C.; et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* **2003**, *18*, 99–115. [[CrossRef](#)]
326. Torregrosa-Carrión, R.; Zurita, L.L.; García-Marqués, F.; D'Amato, G.; Piñeiro-Sabarís, R.; Bonzón-Kulichenko, E.; Vázquez, J.; de la Pompa, J.L. NOTCH Activation Promotes Valve Formation by Regulating the Endocardial Secretome. *Mol. Cell. Proteom.* **2019**, *18*, 1782–1795. [[CrossRef](#)]
327. Tushima, T.; Watanabe, T.; Narumi, T.; Otaki, Y.; Shishido, T.; Aono, T.; Goto, J.; Watanabe, K.; Sugai, T.; Takahashi, T.; et al. Therapeutic inhibition of microRNA-34a ameliorates aortic valve calcification via modulation of Notch1-Runx2 signaling. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 983–994. [[CrossRef](#)]
328. Raddatz, A.M.; Roest, M.J.V.; Merryman, W.D. Notch1 suppression by microRNA-34a: A new mechanism of calcific aortic valve disease. *Cardiovasc. Res.* **2019**, *116*, 871–873. [[CrossRef](#)]
329. Wang, L.; Tang, R.; Zhang, Y.; Chen, S.; Guo, Y.; Wang, X.; Liu, Z.; Liu, H.; Zhang, X.; Liu, B.C. PTH-induced EndMT via miR-29a-5p/GSAP/Notch1 pathway contributed to valvular calcification in rats with CKD. *Cell Prolif.* **2021**, *54*, e13018. [[CrossRef](#)]
330. Dai, Y.; Yan, T.; Gao, Y. Silence of miR-32-5p promotes endothelial cell viability by targeting KLF2 and serves as a diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Diagn. Pathol.* **2020**, *15*, 19. [[CrossRef](#)]
331. Natarelli, L.; Schober, A. Janus-Faced Role of Krüppel-Like Factor 2-Dependent Regulation of MicroRNAs in Endothelial Proliferation. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 1605–1606. [[CrossRef](#)]
332. Liu, H.; Li, G.; Zhao, W.; Hu, Y. Inhibition of MiR-92a may protect endothelial cells after acute myocardial infarction in rats: Role of KLF2/4. *Med. Sci. Monit.* **2016**, *22*, 2451–2462. [[CrossRef](#)]
333. Demolli, S.; Doebele, C.; Doddaballapur, A.; Lang, V.; Fisslthaler, B.; Chavakis, E.; Vinciguerra, M.; Sciacca, S.; Henschler, R.; Hecker, M.; et al. MicroRNA-30 mediates anti-inflammatory effects of shear stress and KLF2 via repression of angiopoietin 2. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *88*, 111–119. [[CrossRef](#)]
334. Hergenreider, E.; Heydt, S.; Tréguer, K.; Boettger, T.; Horrevoets, A.J.G.; Zeiher, A.M.; Scheffer, M.P.; Frangakis, A.S.; Yin, X.; Mayr, M.; et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 249–256. [[CrossRef](#)]
335. Sindi, H.A.; Russomanno, G.; Satta, S.; Salam, V.A.; Jo, K.B.; Qazi-Chaudhry, B.; Ainscough, A.J.; Szulcek, R.; Bogaard, H.J.; Morgan, C.C.; et al. Therapeutic potential of KLF2-induced exosomal microRNAs in pulmonary hypertension. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1185. [[CrossRef](#)]
336. Cui, S.; Liu, Z.; Tao, B.; Fan, S.; Pu, Y.; Meng, X.; Li, D.; Xia, H.; Xu, L. MiR-145 attenuates cardiac fibrosis through the AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway by directly targeting SOX9 in fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **2020**, *122*, 209–221. [[CrossRef](#)]
337. Li, J.; Cao, Y.; Ma, X.-J.; Wang, H.-J.; Zhang, J.; Luo, X.; Chen, W.; Wu, Y.; Meng, Y.; Yuan, Y.; et al. Roles of miR-1-1 and miR-181c in ventricular septal defects. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 1441–1446. [[CrossRef](#)]
338. Cheng, N.; Li, L.; Wu, Y.; Wang, M.; Yang, M.; Wei, S.; Wang, R. microRNA-30e up-regulation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury and promotes ventricular remodeling via SOX9 repression. *Mol. Immunol.* **2020**, *130*, 96–103. [[CrossRef](#)]
339. Zhang, Y.; Tian, C.; Liu, X.; Zhang, H. Identification of Genetic Biomarkers for Diagnosis of Myocardial Infarction Compared with Angina Patients. *Cardiovasc. Ther.* **2020**, *2020*, 8535314. [[CrossRef](#)]
340. Saadat, S.; Noureddini, M.; Mahjoubin-Tehran, M.; Nazemi, S.; Shojaie, L.; Aschner, M.; Maleki, B.; Abbasi-Kolli, M.; Rajabi Moghadam, H.; Alani, B.; et al. Pivotal Role of TGF- β /Smad Signaling in Cardiac Fibrosis: Non-coding RNAs as Effectual Players. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *7*, 256. [[CrossRef](#)]

341. Milano, G.; Biemmi, V.; Lazzarini, E.; Balbi, C.; Ciullo, A.; Bolis, S.; Ameri, P.; Di Silvestre, D.; Mauri, P.; Barile, L.; et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity. *Cardiovasc. Res.* **2020**, *116*, 383–392. [[CrossRef](#)]
342. Zhang, W.; Wang, Q.; Feng, Y.; Chen, X.; Yang, L.; Xu, M.; Wang, X.; Li, W.; Niu, X.; Gao, D. MicroRNA-26a Protects the Heart Against Hypertension-Induced Myocardial Fibrosis. *J. Am. Heart Assoc.* **2020**, *9*, e017970. [[CrossRef](#)]
343. Dong, D.; Zhang, Y.; Reece, E.A.; Wang, L.; Harman, C.R.; Yang, P. microRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets modulated by oxidative stress during embryonic heart development in diabetic mice. *Reprod. Toxicol.* **2016**, *65*, 365–374. [[CrossRef](#)]
344. Baldini, A.; Fulcoli, F.; Illingworth, E. Chapter Eight—Tbx1: Transcriptional and Developmental Functions. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2017**, *122*, 223–243. [[CrossRef](#)]
345. Pan, Y.; Wang, Z.-G.; Liu, X.-Y.; Zhao, H.; Zhou, N.; Zheng, G.-F.; Qiu, X.-B.; Li, R.-G.; Yuan, F.; Shi, H.-Y.; et al. A Novel TBX1 Loss-of-Function Mutation Associated with Congenital Heart Disease. *Pediatr. Cardiol.* **2015**, *36*, 1400–1410. [[CrossRef](#)]
346. Cao, M.-L.; Zhu, B.-L.; Sun, Y.-Y.; Qiu, G.-R.; Fu, W.-N.; Jiang, H.-K. MicroRNA-144 Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Apoptosis by Targeting TBX1 through the JAK2/STAT1 Pathway. *Cytogenet. Genome Res.* **2019**, *159*, 190–200. [[CrossRef](#)]
347. Aravalli, R.N.; Greten, T.F. FoxC1: Novel Regulator of Inflammation-Induced Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **2015**, *149*, 861–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
348. Prasitsak, T.; Nandar, M.; Okuhara, S.; Ichinose, S.; Ota, M.S.; Iseki, S. Foxc1 is required for early stage telencephalic vascular development. *Dev. Dyn.* **2015**, *244*, 703–711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
349. Lambers, E.; Arnone, B.; Fatima, A.; Qin, G.; Wasserstrom, J.A.; Kume, T. Foxc1 Regulates Early Cardiomyogenesis and Functional Properties of Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* **2016**, *34*, 1487–1500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
350. Henn, D.; Abu-Halima, M.; Wermke, D.; Falkner, F.; Thomas, B.; Köppler, C.; Ludwig, N.; Schulte, M.; Brockmann, M.A.; Kim, Y.-J.; et al. MicroRNA-regulated pathways of flow-stimulated angiogenesis and vascular remodeling in vivo. *J. Transl. Med.* **2019**, *17*, 22. [[CrossRef](#)]
351. Mellor, R.H.; Brice, G.; Stanton, A.W.; French, J.; Smith, A.; Jeffery, S.; Levick, J.R.; Burnand, K.G.; Mortimer, P.S. Mutations in FOXC2 Are Strongly Associated With Primary Valve Failure in Veins of the Lower Limb. *Circulation* **2007**, *115*, 1912–1920. [[CrossRef](#)]
352. Zeng, N.; Huang, Y.-Q.; Yan, Y.-M.; Hu, Z.-Q.; Zhang, Z.; Feng, J.-X.; Guo, J.-S.; Zhu, J.-N.; Fu, Y.-H.; Wang, X.-P.; et al. Diverging targets mediate the pathological role of miR-199a-5p and miR-199a-3p by promoting cardiac hypertrophy and fibrosis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2021**, *26*, 1035–1050. [[CrossRef](#)]
353. Cao, Y.; Cao, Z.; Wang, W.; Jie, X.; Li, L. MicroRNA-199a-5p regulates FOXC2 to control human vascular smooth muscle cell phenotypic switch. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *24*, 627. [[CrossRef](#)]
354. Du, B.; Cawthorn, W.P.; Su, A.; Doucette, C.R.; Yao, Y.; Hemati, N.; Kampert, S.; McCoin, C.; Broome, D.T.; Rosen, C.J.; et al. The Transcription Factor Paired-Related Homeobox 1 (Prrx1) Inhibits Adipogenesis by Activating Transforming Growth Factor- β (TGF β) Signaling. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 3036–3047. [[CrossRef](#)]
355. Zhong, X.; Yu, X.; Wen, X.; Chen, L.; Gu, N. Activation of the LINC00242/miR-141/FOXC1 axis underpins the development of gastric cancer. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 272. [[CrossRef](#)]
356. Jiang, Y.; Mo, H.; Luo, J.; Zhao, S.; Liang, S.; Zhang, M.; Yuan, J. HOTAIR Is a Potential Novel Biomarker in Patients with Congenital Heart Diseases. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 850657. [[CrossRef](#)]
357. Moorman, A.F.M.; Christoffels, V.M. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 1223–1267. [[CrossRef](#)]
358. Kelly, R.G.; Buckingham, M.E.; Moorman, A.F. Heart Fields and Cardiac Morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a015750. [[CrossRef](#)]
359. Kelly, R.G.; Buckingham, M.E. The anterior heart-forming field: Voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet.* **2002**, *18*, 210–216. [[CrossRef](#)]
360. Erhardt, S.; Zheng, M.; Zhao, X.; Le, T.; Findley, T.; Wang, J. The Cardiac Neural Crest Cells in Heart Development and Congenital Heart Defects. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2021**, *8*, 89. [[CrossRef](#)]
361. Saretzki, E.; Pankratz, F.; Engert, B.; Grundmann, S.; Bode, C.; Moser, M.; Zhou, Q.; Esser, J.S. Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR-494 and miR-126-5p in control of endothelial cell function in angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **2017**, *117*, 734–749. [[CrossRef](#)]
362. Yanagawa, B.; Lovren, F.; Pan, Y.; Garg, V.; Quan, A.; Tang, G.; Singh, K.K.; Shukla, P.C.; Kalra, N.P.; Peterson, M.D.; et al. miRNA-141 is a novel regulator of BMP-2-mediated calcification in aortic stenosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2012**, *144*, 256–262.e2. [[CrossRef](#)]
363. Balderman, J.A.F.; Lee, H.; Mahoney, C.E.; Handy, D.E.; White, K.; Annis, S.; Lebeche, D.; Hajjar, R.J.; Loscalzo, J.; Leopold, J.A. Bone Morphogenetic Protein-2 Decreases MicroRNA-30b and MicroRNA-30c to Promote Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *J. Am. Heart Assoc.* **2012**, *1*, e003905. [[CrossRef](#)]
364. Song, R.; Fullerton, D.A.; Ao, L.; Zhao, K.-S.; Meng, X. An epigenetic regulatory loop controls pro-osteogenic activation by TGF- β 1 or bone morphogenetic protein 2 in human aortic valve interstitial cells. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 8657–8666. [[CrossRef](#)]

365. Yousefi, F.; Shabaninejad, Z.; Vakili, S.; Derakhshan, M.; Movahedpour, A.; Dabiri, H.; Ghasemi, Y.; Mahjoubin-Tehran, M.; Nikoozadeh, A.; Savardashtaki, A.; et al. TGF- β and WNT signaling pathways in cardiac fibrosis: Non-coding RNAs come into focus. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 87. [[CrossRef](#)]
366. Zhang, C.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Hu, J.; Xie, Z. MiR-34a/miR-93 target c-Ski to modulate the proliferation of rat cardiac fibroblasts and extracellular matrix deposition in vivo and in vitro. *Cell. Signal.* **2018**, *46*, 145–153. [[CrossRef](#)]
367. He, X.; Zhang, K.; Gao, X.; Li, L.; Tan, H.; Chen, J.; Zhou, Y. Rapid atrial pacing induces myocardial fibrosis by down-regulating Smad7 via microRNA-21 in rabbit. *Heart Vessel.* **2016**, *31*, 1696–1708. [[CrossRef](#)]
368. Zhang, D.; Cui, Y.; Li, B.; Luo, X.; Li, B.; Tang, Y. MiR-155 regulates high glucose-induced cardiac fibrosis via the TGF- β signaling pathway. *Mol. Biosyst.* **2016**, *13*, 215–224. [[CrossRef](#)]
369. Wang, Y.; Cai, H.; Li, H.; Gao, Z.; Song, K. Atrial overexpression of microRNA-27b attenuates angiotensin II-induced atrial fibrosis and fibrillation by targeting ALK5. *Hum. Cell* **2018**, *31*, 251–260. [[CrossRef](#)]
370. Hong, Y.; Cao, H.; Wang, Q.; Ye, J.; Sui, L.; Feng, J.; Cai, X.; Song, H.; Zhang, X.; Chen, X. MiR-22 may Suppress Fibrogenesis by Targeting TGF β R I in Cardiac Fibroblasts. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *40*, 1345–1353. [[CrossRef](#)]
371. Yu, R.-B.; Li, K.; Wang, G.; Gao, G.-M.; Du, J.-X. MiR-23 enhances cardiac fibroblast proliferation and suppresses fibroblast apoptosis via targeting TGF- β 1 in atrial fibrillation. *Eur. Rev. Med Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 4419–4424.
372. Xu, J.; Wu, H.; Chen, S.; Qi, B.; Zhou, G.; Cai, L.; Zhao, L.; Wei, Y.; Liu, S. Micro RNA -30c suppresses the pro-fibrogenic effects of cardiac fibroblasts induced by TGF- β 1 and prevents atrial fibrosis by targeting TGF β RII. *J. Cell. Mol. Med.* **2018**, *22*, 3045–3057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
373. Jiang, Y.J.Y.; Zhuang, J.Z.J.; Lin, Y.L.Y.; Wang, X.W.X.; Chen, J.C.J.; Han, F.H.F. Long noncoding RNA SNHG6 contributes to ventricular septal defect formation via negative regulation of miR-101 and activation of Wnt/ β -catenin pathway. *Die Pharm. -Int. J. Pharm. Sci.* **2019**, *74*, 23–28. [[CrossRef](#)]
374. Zhao, X.; Wei, X.; Wang, X.; Qi, G. Long non-coding RNA NORAD regulates angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells via miR-590-3p under hypoxic conditions. *Mol. Med. Rep.* **2020**, *21*, 2560–2570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
375. Sun, Q.; Luo, M.; Gao, Z.; Han, X.; Yan, Z.; Xie, S.; Zhao, H.; Sun, H. TUG1 knockdown suppresses cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Mamm. Genome* **2021**, *32*, 435–442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
376. García-Padilla, C.; Domínguez, J.N.; Lodde, V.; Munk, R.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M.; Jiménez-Sábado, V.; Ginel, A.; Hove-Madsen, L.; Aránega, A.E.; et al. Identification of atrial-enriched lncRNA Walras linked to cardiomyocyte cytoarchitecture and atrial fibrillation. *FASEB J.* **2021**, *36*, e22051. [[CrossRef](#)]
377. Das, A.; Shyamal, S.; Sinha, T.; Mishra, S.S.; Panda, A.C. Identification of Potential circRNA-microRNA-mRNA Regulatory Network in Skeletal Muscle. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 762185. [[CrossRef](#)]



Review

LncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Tumorigenesis

Carlos Garcia-Padilla ^{1,2,*}, Estefanía Lozano-Velasco ^{1,2,3}, María del Mar Muñoz-Gallardo ², Juan Manuel Castillo-Casas ², Sheila Caño-Carrillo ², Francisco José Martínez-Amaro ², Virginio García-López ¹, Amelia Aránega ^{2,3}, Diego Franco ^{2,3}, Virginio García-Martínez ¹ and Carmen López-Sánchez ^{1,*}

¹ Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Institute of Molecular Pathology Biomarkers, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain; evelasco@ujaen.es (E.L.-V.); garcialopez@unex.es (V.G.-L.); virginio@unex.es (V.G.-M.)

² Department of Experimental Biology, University of Jaen, 23071 Jaen, Spain; mmmg0012@red.ujaen.es (M.d.M.M.-G.); jmcc0028@red.ujaen.es (J.M.C.-C.); scano@ujaen.es (S.C.-C.); fmamaro@ujaen.es (F.J.M.-A.); aaranega@ujaen.es (A.A.); dfranco@ujaen.es (D.F.)

³ Fundación Medina, 18016 Granada, Spain

* Correspondence: carlogp@unex.es (C.G.-P.); clopez@unex.es (C.L.-S.)

Abstract: Various treatments based on drug administration and radiotherapy have been devoted to preventing, palliating, and defeating cancer, showing high efficiency against the progression of this disease. Recently, in this process, malignant cells have been found which are capable of triggering specific molecular mechanisms against current treatments, with negative consequences in the prognosis of the disease. It is therefore fundamental to understand the underlying mechanisms, including the genes—and their signaling pathway regulators—involved in the process, in order to fight tumor cells. Long non-coding RNAs, H19 in particular, have been revealed as powerful protective factors in various types of cancer. However, they have also evidenced their oncogenic role in multiple carcinomas, enhancing tumor cell proliferation, migration, and invasion. In this review, we analyze the role of lncRNA H19 impairing chemo and radiotherapy in tumorigenesis, including breast cancer, lung adenocarcinoma, glioma, and colorectal carcinoma.

Keywords: lncRNA H19; chemo-resistance; radio-resistance; tumorigenesis



Citation: Garcia-Padilla, C.; Lozano-Velasco, E.; Muñoz-Gallardo, M.d.M.; Castillo-Casas, J.M.; Caño-Carrillo, S.; Martínez-Amaro, F.J.; García-López, V.; Aránega, A.; Franco, D.; García-Martínez, V.; et al. LncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8309. <https://doi.org/10.3390/ijms23158309>

Academic Editor: Nicoletta Potenza

Received: 30 June 2022

Accepted: 25 July 2022

Published: 27 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

For decades, scientists have considered non-coding RNAs (ncRNAs) as a non-functional part of the genome, focusing their attention primarily on coding RNA biology. The sequencing of the human genome and later the ENCODE project have shown that more than 80% of the genome is transcribed in some type of RNA. Interestingly, only 3% of this transcribed genome corresponds to coding RNAs, suggesting that ncRNAs are as significant or more significant than coding RNAs [1,2]. It has been demonstrated that non-coding RNAs are essential for the regulation of cellular pathways and biological processes such as cell development, differentiation, growth, and homeostasis, as well as diseases [3–6].

According to their length, ncRNAs can be classified into: (i) small non-coding RNAs, with less than 200 nucleotides, including microRNAs, snoRNAs, piRNAs, and tRNAs [7]; and (ii) long non-coding RNAs (lncRNAs) with more than 200 nucleotides, including intronic lncRNAs, enhancer lncRNAs, circular lncRNAs, and intergenic lncRNAs [8].

With respect to microRNAs, these present 20–22 ribonucleotides in length on average and display the capacity to bind to the 3' untranslated region (3'UTR) of coding RNAs by complementary base pairing, promoting their degradation and/or translational blockage. The role of microRNAs as post-transcriptional modulators has been widely described in multiple biological and cellular processes, including cell development, differentiation, growth, and homeostasis, as well as diseases [9–12].

In the case of lncRNAs, these are structurally similar to mRNAs since they are transcribed by RNA polymerase II, and have the same typical post-transcriptional modifications, in 5' terminal cap and 3' terminal poly (A) in particular. Notably, they lack the capacity to code proteins. Mechanistically, lncRNAs can act both as transcriptional regulators (by modulation of nuclear gene expression in different ways, including epigenetic landscape control, transcriptional complex scaffolding, and decoy molecules) and as post-transcriptional regulators (modulating microRNA degradation, mRNA stability, and/or protein translation). A deeper study of these lncRNAs roles will help us to better understand the regulation of multiple biological processes [13–16].

A particular lncRNA, H19 (produced by H19 gene), is abundantly expressed during embryonic development, mainly in derived tissues from the endoderm and mesoderm, and downregulated after birth, except for muscle tissues, such as skeletal and cardiac muscles [17–19]. H19 gene is highly conserved between primates and rodents, maintaining both structure and expression pattern in different species. However, it shows substantial differences in terms of the putative ORFs (open reading frames) arrangement present in this gene, which exhibits 5 exons separated by 4 introns, structurally [20]. While in humans a maximum of 13 different isoforms are observed, only 7 are identified in mice. H19 gene generates a 2.3 kb transcript with a cap in 5' end and a polyA tail in 3' end [21]. Subcellular expression of H19 depends on cellular type and biological context, showing its expression both in the cytoplasm and nucleus [22,23]. In the genome, H19 gene is located within a locus highly regulated by epigenomic machinery. This locus, named H19-Igf2, showing several differentially methylated regions (DMRs) and imprinting control regions (ICRs), leads to intensive modulation of genes contained in it, depending on the process and/or biological context [24,25]. Interestingly, H19 encodes the primary microRNA precursor for miR-675. The expression of this microRNA is not dependent on RNA H19 transcription, although both expressions are correlated in several biological processes [26,27]. The H19 gene has been studied for some time now, although its function is still not well defined. In particular, it acts as a trans-regulator of a group of co-expressed genes as part of an imprinted network, which is likely to control cellular homeostasis [24–27].

Taking into account that non-coding RNA genome has proved to play a pivotal role, both as tumor suppressor and oncogenic molecules in cancer therapy [28–32], it is critical to understand the underlying molecular mechanisms in favor of new therapeutic approaches for cancer treatment efficiency. Since the resistance to chemo and radiotherapy constitutes a crucial factor involved in disease relapse and metastasis [33,34], it is of great importance to establish the intrinsic factors involved in this process. Known molecular mechanisms of chemo and radioresistance include transporter pumps, oncogenes, tumor suppressor gene, mitochondrial alteration, DNA repair, autophagy, epithelial–mesenchymal transition (EMT), cancer stemness, and exosome and extensive epigenetic regulation, among others [35–38]. Noticeably, abnormal expression of lncRNA H19 has been found in different types of tumor cells, affecting cancer progression through different mechanisms, either as a suppressor or oncogenic gene, depending on cellular context [39–45]. For this reason, clinically, lncRNA H19 could be useful as a biomarker of diagnosis, therapy, and prognosis in cancer [46,47]. In this sense, those clear-cut mechanisms underlying the H19 regulatory roles in the biological progression of cancer requires further investigation.

Consequently, in this review, we analyze the impact of lncRNA H19 as a responsible factor in chemo and radioresistance of malignant cells, including their underpinning molecular mechanisms, specifically breast cancer, lung adenocarcinoma, glioma, and colorectal carcinoma.

2. lncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Breast Cancer

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer mortality in females worldwide [48]. Broadly, breast cancer patients can be classified into estrogen receptor positive (ER+)—corresponding to 70% of total cases—or estrogen receptor negative (ER–) [49,50]. Drug treatment against both types of breast

cancer differs from each other, since several drugs are antagonists of estrogen receptors and exerting their functions blocking binding between ER and estrogens. This binding leads to disrupting the activation of downstream signaling pathway dependent of RE-estrogens interaction [51]. Currently, administration of three drugs, tamoxifen (TMX), doxorubicin (DOX), and paclitaxel (PTX), are considered as first-line of chemotherapy [52]. The application of any of these drugs separately or in combination with different types of drugs that enhance their cytotoxicity against malignant cells, considerably improves the clinical outcome of breast cancer, even though their continuous use results in acquired resistance of breast cancer cells against drug treatment [53–55]. To reverse such resistance and re-sensitize cells to different drugs, it is vitally important to understand the underlying molecular mechanisms that modulate their resistance acquisition. Several studies have pointed out the role of H19 as a powerful oncogenic agent in this process, pinpointing it as a critical modulator of chemoresistance (Figure 1).

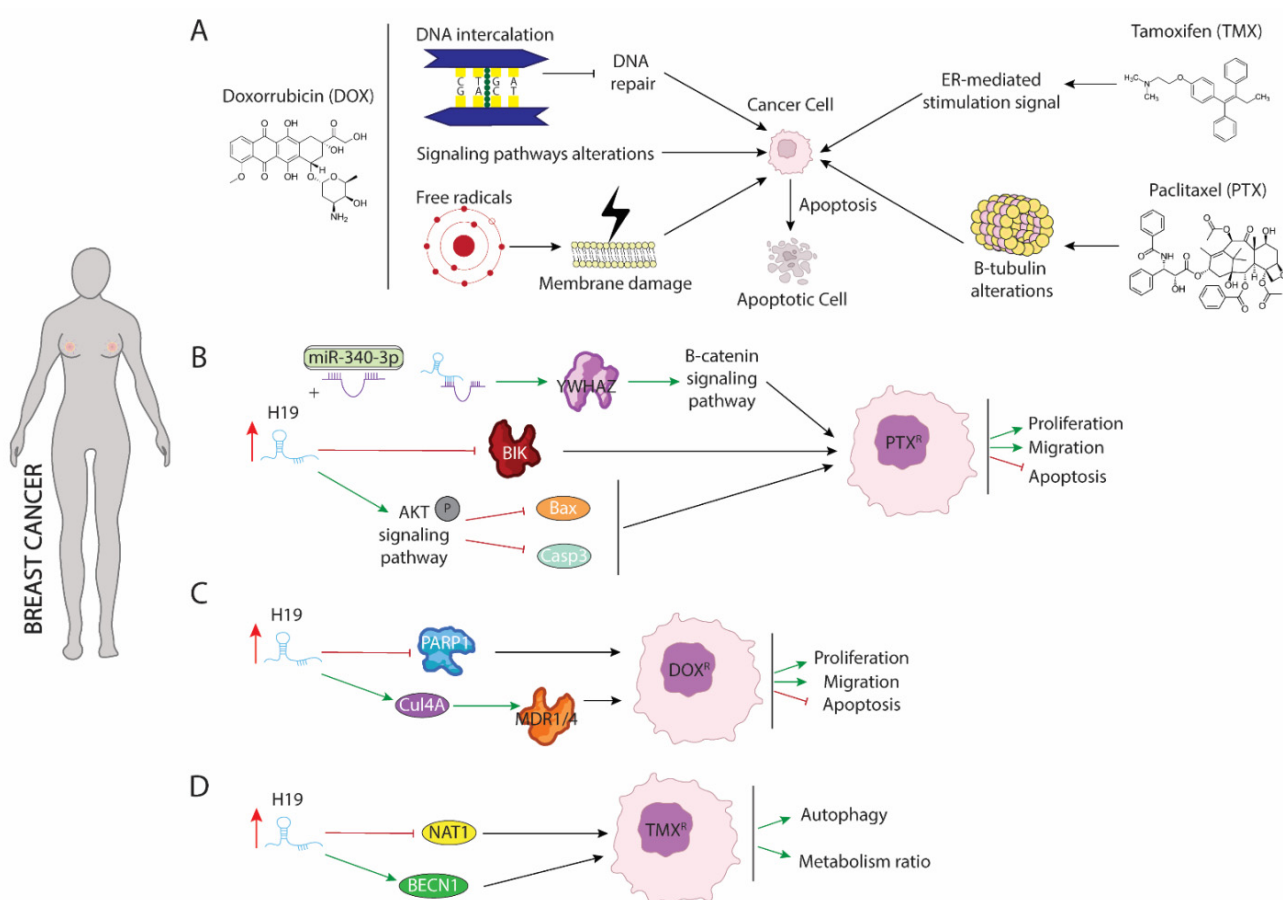


Figure 1. Schematic representation of molecular mechanism dependent of H19 function in breast cancer. **(A)** Modes of action of paclitaxel (PTX), doxorubicin (DOX), and tamoxifen (TMX) drugs involved in breast cancer treatment. **(B)** Role of H19 as a sponge to binding miR-340 enhancing expression of YWHAZ protein and increasing proliferation and migration while blocking apoptosis. **(C)** H19 increase expression of CUL4A and repress expression of PARP1 lead to DOX resistance in breast cancer. **(D)** H19 modulates methylation of BECN1 promotor and blocking NAT1 expression enhancing autophagy and metabolism procedures.

Paclitaxel (PTX) is the most commonly used antitumor treatment drug on several types of carcinomas [55]. Mechanistically, PTX action includes several signaling pathways in which PTX modulates cellular processes that results in programmed cell death triggering. PTX is considered as the first-line treatment drug in breast cancer (BC), especially in triple negative breast cancer (TNBC) [56], since this subtype of carcinoma is not sensitive

to estrogen receptor positive breast cancer cell. Unfortunately, the resistance of BC to PTX treatment is a great obstacle in clinical applications and one of the major causes of death associated with treatment failure. In breast cancer, PTX (Figure 1A) induces cellular apoptosis by interacting with β -tubulin and altering microtubules stability. PTX-resistance is acquired by mutations in α or β -tubulin, enhancing p53 and AKT activation signaling pathways or by dysregulation of apoptotic proteins [57,58]. Functional assays in both ER(+)-MCF-7 and ER(-)-Triple negative breast cancer (TNBC) carcinomas have shown that acquisition of resistance to PTX requires the upregulation of H19 (Figure 1B), which in turn blocks activation of several apoptotic pathways. Curiously, in ER α + breast cancer, H19 modulates resistance of PTX at both transcriptional and post-transcriptional levels. Si et al. (2016) [59] demonstrated that upregulation of H19 in MCF-7 cell line inhibited transcription of BCL-2 interacting killer protein (BIK)—a proapoptotic BH3-only member of the BCL-2 family which is prognostic for relapse and decreased overall survival of breast cancer [60]—by recruiting EZH2 subunit to the promoter of this gene, modulating H3 methylation at lysine 27. As result of BIK promoter methylation, PTX-resistance MCF-7 cells display increased proliferation rate and decreased cellular apoptosis [59]. Furthermore, H19 blocks miR-340-3p function—a known tumor suppressor miRNA involved in repression of EMT—acting as competitive sponge and avoiding degradation of tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (YWHAZ), which in turn enhances activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. As results of increased activity of YWHAZ-Wnt/ β -catenin axis, PTX-resistance cells exhibit increased metastasis, invasion, and EMT. Additionally, the phenotype associated with H19 upregulation is recapitulated in both xenograft models and biopsies from patients with PTX resistance [61]. Unlike ER(+), increased H19 levels in TNBC promote activation of AKT by phosphorylation. As a consequence of enhancing AKT activity, BAX and cleaved caspase 3 are repressed, and cellular apoptosis is inhibited. Furthermore, downregulation of H19 in TNBC is translated into lower tumor growth rate in vivo and reduced cell proliferation accompanied by higher rates of apoptosis [62].

Doxorubicin (DOX) is a member of the anthracycline family and currently is one of the main treatments of choice for the treatment of both ER+ and ER- breast cancer [54]. DOX negatively affects the survival of malignant cells through different mechanisms of action (Figure 1A): (1) DOX is capable of mediating intercalation into DNA and disruption of topoisomerase-II function, avoiding DNA repair, and increasing cellular apoptosis; (2) DOX promotes generation of free radicals and their damage to cellular membranes, proteins, and DNA; (3) DOX deregulates several pivotal pathways involved in tumorigenesis such as PI3K/mTOR/AKT or ERK signaling [63]. Several studies have pointed out H19 as a major mediator of DOX chemoresistance (Figure 1C) by modulating MDR1/MDR4 and PARP1 expression [64,65]. Increased expression of H19 is required for the acquisition of DOX-resistance in several breast cancer cell lines. Curiously, downregulation of H19 reduces cell viability, lowers colony forming, and increases apoptosis under DOX treatment. Mechanistically, H19 promotes expression of Cullin 4A (CUL4A), a ubiquitin ligase component [66], which in turn enhances expression of ABCB1/4 genes that encoded MDR1/4 proteins, two members of the ATP-binding cassette family highly upregulated in several carcinomas, including breast cancer [67,68]. Both proteins exert pivotal functions in oncogenesis acting as inductors of multidrug resistance [69]. However, the molecular mechanisms dependent on MRD1/MDR4 are still unclear and require additional and intensive investigations. Wang et al. (2020) [65] showed that H19-induced DOX-chemoresistance is mediated by repression of PARP1. In MCF-7, high levels of H19 were correlated with downregulated PARP1 expression. Even though PARP1 is upregulated in several types of carcinomas and PARP1 inhibitors have been described as pivotal drugs against tumorigenesis, PARP1 has been shown to increase the antitumor activity of other drugs such as temozolomide and topotecan in preclinical studies, including models of pediatric cancers [70–72]. Curiously, it is capable of being packaged into exosomes from resistance cells and this diffusion towards sensitive cells leads to the acquisition of resistance against DOX treatment [73].

Tamoxifen (TMX), an anti-estrogen (Figure 1A), competitively inhibits estrogen binding to the ER and blocks the ER-mediated stimulation signal [53]. Five years of tamoxifen adjuvant therapy has been shown to safely reduce 15-year risk of breast cancer recurrence and death; however, a substantial group of patients was shown to eventually develop resistance (de novo or acquired) to tamoxifen. Although many molecular mechanisms of tamoxifen resistance have been described, including mutations in the ESR1 gene and the activation of alternative growth pathways, such as ERBB2/HER2, EGFR, IGF1R, and cyclin D1/CDK4/6 pathways, it remains necessary to gain an improved understanding of the potential mechanisms of tamoxifen resistance [74–77]. Several studies have pointed out the importance of upregulation of H19 in TMX resistance acquisition. Increased level of H19 in TMX-resistance cells (Figure 1D) is translated into enhanced autophagy activity and higher metabolism ratio by upregulation of Beclin1 (BECN1) and downregulation of N-acetyltransferase-1 (NAT1) transcription, respectively [78,79]. H19 downregulates the methylation state of Beclin1 promoter by binding and inhibiting S-adenosyl homocysteine hydrolase (SAHH). As consequence, DNMT3B function is reduced, resulting in lower ratio of methylation of Beclin1 promoter and thus higher Beclin1 expression [78]. Additionally, H19 modulate methylation of NAT1 promoter reducing transcription of it. NAT1 exert a pivotal role in metabolism of carcinogens and it is negatively correlated with a poor prognosis and aggressiveness of ER(+) breast cancer [79].

3. LncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)

Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is a receptor tyrosine kinase (RTK) mediated signaling commonly upregulated in many different tumors such as non-small-cell lung cancer, metastatic colorectal cancer, glioblastoma, pancreatic cancer, and breast cancer [80–82]. Upregulation of EGRF activity is caused by distinct mutations or truncations on both extracellular and/or kinase domain such as EGFRvIII truncations or L858R mutations, respectively. EGFR positively modulates PIK3/mTOR/AKT oncogenic signaling pathway by increasing phosphorylation, which in turn promotes proliferation, survival, and invasion of malignant cells [83]. Since the importance of it as a pivotal oncogenetic modulator, EGFR has been pinpointed as a powerful therapeutic target against different tumors types including small non cell lung cancer (NSCLC) [84,85]. Several inhibitors—such as Erlotinib and Gefinitib—(Figure 2) have been used to block EGFR function and activation of signaling pathway downstream PIK3/mTOR/AKT [86,87]. Although both drugs have been described as effective treatment against NSCLC, improving prognosis of disease and progression-free survival (PFS), many reports have revealed that continued administration is translated into acquired resistance. Underlying molecular mechanism of acquired resistance to chemotherapy is poor understanding. Chen et al. (2020) [88] demonstrated that acquisition of resistance to Erlotinib treatment in lung adenocarcinoma requires H19 silencing. Interestingly, both Erlotinib-resistant tumor from different patients and Erlotinib-resistant cell lines display low H19 expression levels. Functional assays demonstrated that gain-of-function of H19 in Erlotinib resistance cell lines result in restored drug sensibility. H19 reduces pyruvate kinase M1/2 (PKM2) protein level, promoting ubiquitin dependent degradation, which is essential for AKT phosphorylation and thus leads to disruption of PIK3/mTOR/AKT signaling. Furthermore, inhibition of PKM2 both in cells resistant to Erlotinib and in H19 knockout cells is translated into increased sensitivity to this drug indicating that Erlotinib-resistance is mediated by PKM2. Likewise, downregulation of H19 reduces sensibility to treatment with Erlotinib. Repression of H19 in Erlotinib-resistance increases PKM2 protein levels which in turn enhances AKT phosphorylation (Figure 2B). Curiously, AKT activity significantly reduces H19 expression, suggesting a negative feedback between H19-PKM2-AKT [88]. Conversely, Pan and Zhau (2020) [89] demonstrated that H19 is upregulated in exosomes of serum samples from non-responding erlotinib treatment patients suggesting that H19 could promote erlotinib resistance. Mechanically, H19 acts as a sponge of miR-615-3p, which in turn represses ATG7 translation, an onco-

genic protein involved in autophagy response of different types of carcinomas [90,91]. As a consequence of H19-miR-615-3p competing mechanism, ATG7 translation is enhanced, leading to increased proliferation and survival of malignant cells (Figure 2B). Furthermore, H19 packaging into exosomes reduce Erlotinib sensibility to non-resistance Erlotinib cells pinpointing an oncogenic role of H19 [89]. The discrepancies between both studies suggest a complex role of H19 in the acquisition of resistance against Erlotinib that requires further study to be fully understood.

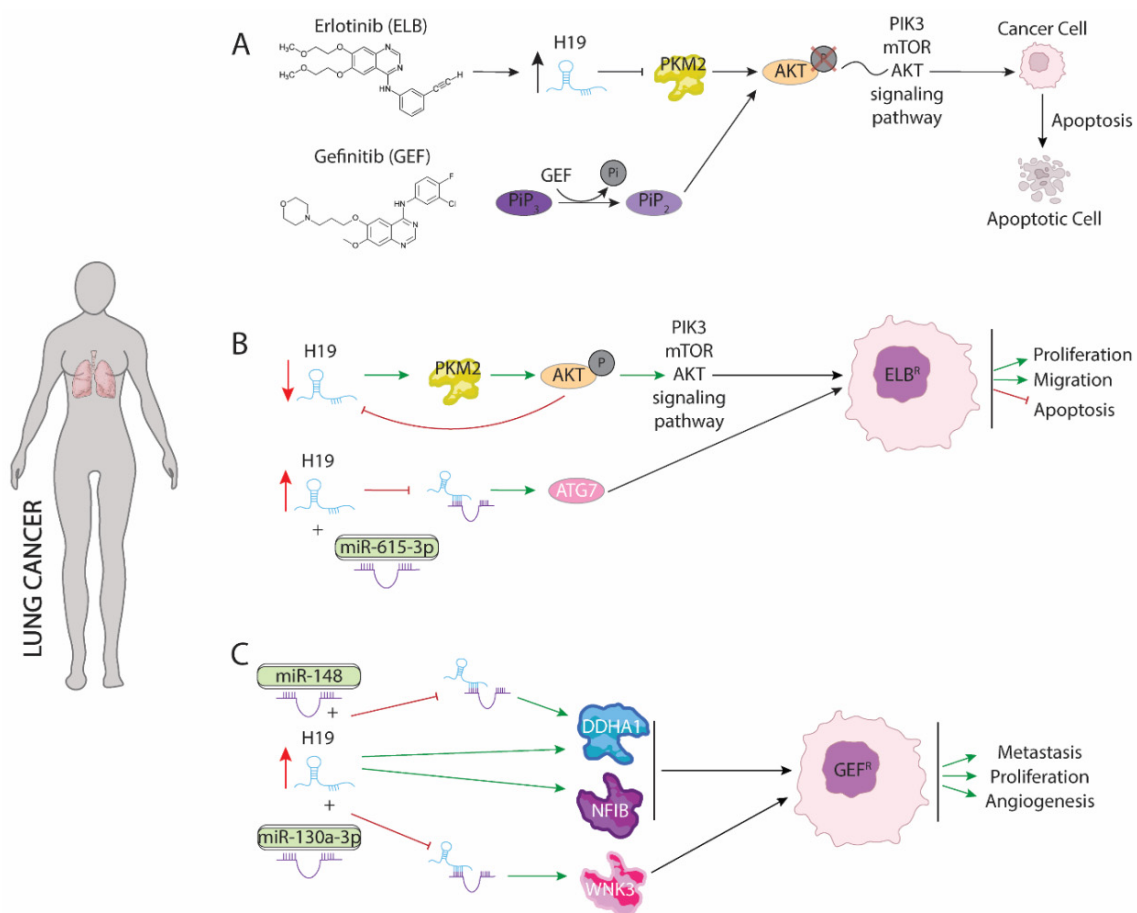


Figure 2. Schematic representation of molecular mechanism dependent of H19 function in lung cancer. (A) Modes of action of Erlotinib (ELB) and Gefinitib (GEF) drugs involved in lung cancer treatment. (B) Dual role of H19 in acquired resistance to Erlotinib modulating PKM2 and ATG7 proteins. (C) Role of H19 as a sponge to binding miR-148 and miR-130a enhancing expression of DDHA1, NFIB and WNK3 proteins increasing proliferation, metastasis, and angiogenesis procedures.

Resistance to Gefinitib is the major obstacle to improving the disease pattern of patients with advanced metastasis in NSCLC. Like Erlotinib, Gefinitib disrupts PI3K/mTOR/AKT pathway reducing phosphorylation. Particularly, Gefinitib removes a phosphate group from PIP3 active form, avoiding mTOR and AKT phosphorylation by increase of PIP2 intracellular pool (Figure 2A), which is indeed the inactive form [91]. Curiously, silencing of H19 expression enhances toxicity effects of Gefinitib in NSCLC. Furthermore, Gefinitib-resistant cell lines display high levels of H19, suggesting a pivotal role in acquisition of resistance. Functional assays have demonstrated that upregulation of H19 is accompanied by promotion of two oncogenic proteins, NFIB and DDHA1, that are involved in metastasis and angiogenesis, respectively. Zhou and Zhang (2020) [92] showed that co-treatment with Gefinitib and H19-shRNA drastically reduced NFIB expression by upregulation of PTEN and PDCD4. As result of downregulation of NFIB, which is considered as marker of metastasis in patients, invasion and spread out of malignant cell is reduced and blocking

of progression of NSCLC is observed [93]. Likewise, upregulation of H19 is translated into increased levels of DDHA1 by competing with miR-148-3p (Figure 2C). H19-miR-148 binding avoids DDHA1 mRNA degradation and promote its translation, which in turn increases angiogenesis and is correlated with a poor patient diagnosis. Additionally, upregulation of miR-148 enhances the effects associated to H19 silencing in NSCLS while downregulation of this microRNA promotes the acquisition of Gefitinib resistance [92]. Curiously, H19 could be transfer via exosomes to non-resistance cells from malign cell that display resistance to Gefitinib drug. As consequence of H19 transference, non-resistance cells do not respond to Gefitinib treatment worsening the prognosis of the disease and PFS by increasing both angiogenesis and metastasis of NSCLC [94].

Similar to observed in Gefitinib treatment, silencing of H19 enhanced sensitivity to radiotherapy by X-ray and carbons-ions in NSCLC cells. Zhao et al. (2021) [95] demonstrated that H19 was upregulated in radioresistant NSCLC (A549-R11) cells compared with control cells. Downregulation of H19 enhanced the sensitivity of NSCLC cell lines to X-ray and carbon ion irradiation. Functional assays have proven that H19 serves as a sponge of miR-130a-3p (Figure 2C), which downregulates WNK3 expression that in turn protects malign cells from apoptosis [95].

Taking all the data described above into account and with the exception of the results obtained by Chen et al., 2020 [88], H19 displays an oncogenic role in lung adenocarcinoma, representing a powerful therapeutic target to avoid and counteract both radiotherapy and chemotherapy resistance.

4. LncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Glioma

Temozolomide (TMZ), an oral alkylating drug which delivers a methyl group to purine bases of DNA (O6-guanine; N7-guanine and N3-adenine), is frequently used together with radiotherapy as part of the first-line treatment of high-grade gliomas [96]. TMZ treatment (Figure 3) blocks the cell cycle at G2/M stage, leading to malign cells towards cellular apoptosis [97]. Although TMZ treatment is effective and provides a significant improve in disease prognosis and patient survival, continuous use leads to acquired resistance. The underlying molecular mechanisms remain unclear but two cellular events are strongly connected to TMZ resistance: (1) extensive changes in epigenetic environment and (2) high generated oxidative stress in malign cells [98]. Curiously, Duan et al. (2018) [99] proved that in response to rising oxidative stress, H19 is upregulated in glioma cells. Induced-H19 (Figure 3B) enhances activation of NF- κ b signaling promoting expression of pivotal oncogenic genes such as Bcl-2 and XIAP—which are upregulated in several human gliomas and to protect from apoptosis cellular [100,101]. As is the case for BCL-2 or XIAP, H19 increases Cyclin D1 expression, which mediates cycle cellular transition leading to a higher proliferative ratio and preventing malignant cells from being retained in the G2/M phase [102]. As a consequence of enhancing expression of those oncogenic genes, TMZ fails to induce cell cycle arrest and apoptosis resulting in acquisition of resistance against this drug [103]. Similar to observed with the genes dependent on NF-Kb pathway, upregulation of H19 positively mediates the expression of genes involved in multi-resistance against several drugs such as MDR1 or MRP. Additionally, H19 active beta-catenin signaling, which in turn enhances expression c-Myc and Survivin protecting glioma cells from programmed cell death. Furthermore, downregulation of cellular apoptosis levels is accompanied by increased spread out and invasion of malign cells as result of enhanced EMT process [104]. H19 reduces expression of E-cadherin, a known protein involved in cell–cell junction, while increasing expression of Vimentin and ZEB1, inductor gene of the EMT process. Curiously, functional assays have demonstrated that TMZ treatment plus siRNA against H19 drastically reduce expression of genes described above. As a consequence of this joint administration, TMZ-glioma resistance is sensitive to effects of drug displaying a high ratio of cellular apoptosis and reduced EMT and metastasis. Therefore, combined use of both could contribute to improve clinical outcome of patients and better prognosis of disease.

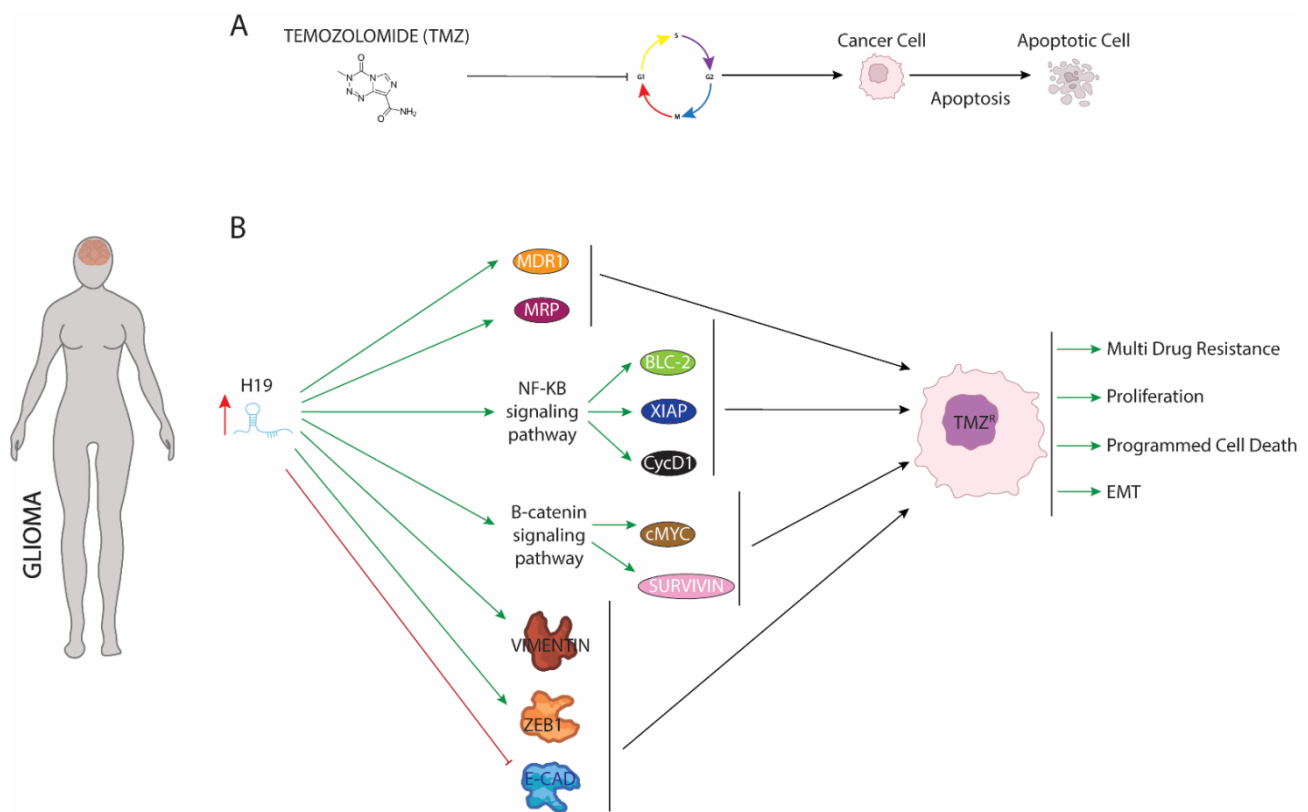


Figure 3. Schematic representation of molecular mechanism dependent of H19 function in glioma. (A) Mode of action of temozolomide. (B) Upregulation of H19 increase expression of proteins involved in multidrug resistance, apoptosis, and EMT procedures enhancing proliferation, programmed cell death, and EMT.

Similar to resistance from TMZ treatment, H19 is upregulated by CREB1 protein under radiotherapy treatment against glioma. Functional assays have proven that H19 was involved in the cell cycle arrest, apoptosis, and DNA synthesis to modulate the radiation response of glioma cells and influenced their radioresistance [105].

5. LncRNA H19 Impairs Chemo and Radiotherapy in Colorectal Cancer

First evidence of involvement of H19 in chemoresistance of colorectal cancer cells was provided by Wu et al. (2017) [106]. Methotrexate (MTX) is a competitive inhibitor of dihydrofolate reductase (DHFR), a pivotal enzyme involved in intracellular folate metabolism [107]. DHFR is required to correct DNA synthesis and cellular growth. Alteration of DHFR function by MTX (Figure 4) results in increased programmed cell death and reduced cell proliferation and growth of malignant cells [108]. However, several carcinomas such as breast, bladder, head and neck cancers, osteogenic sarcoma, leukemia, and colorectal cancer display resistance against MTX. In colorectal cell lines, upregulation of H19 is translated into acquired resistance to MTX by upregulation of β -catenin signaling pathway (Figure 4B), which in turn activated expression of downstream transcriptional targets such as c-Myc, CCND1, CD44, and Oct3/4. Increased expression of genes dependent of β -catenin signaling pathway results in enhanced cellular proliferation and growth ratio [106].

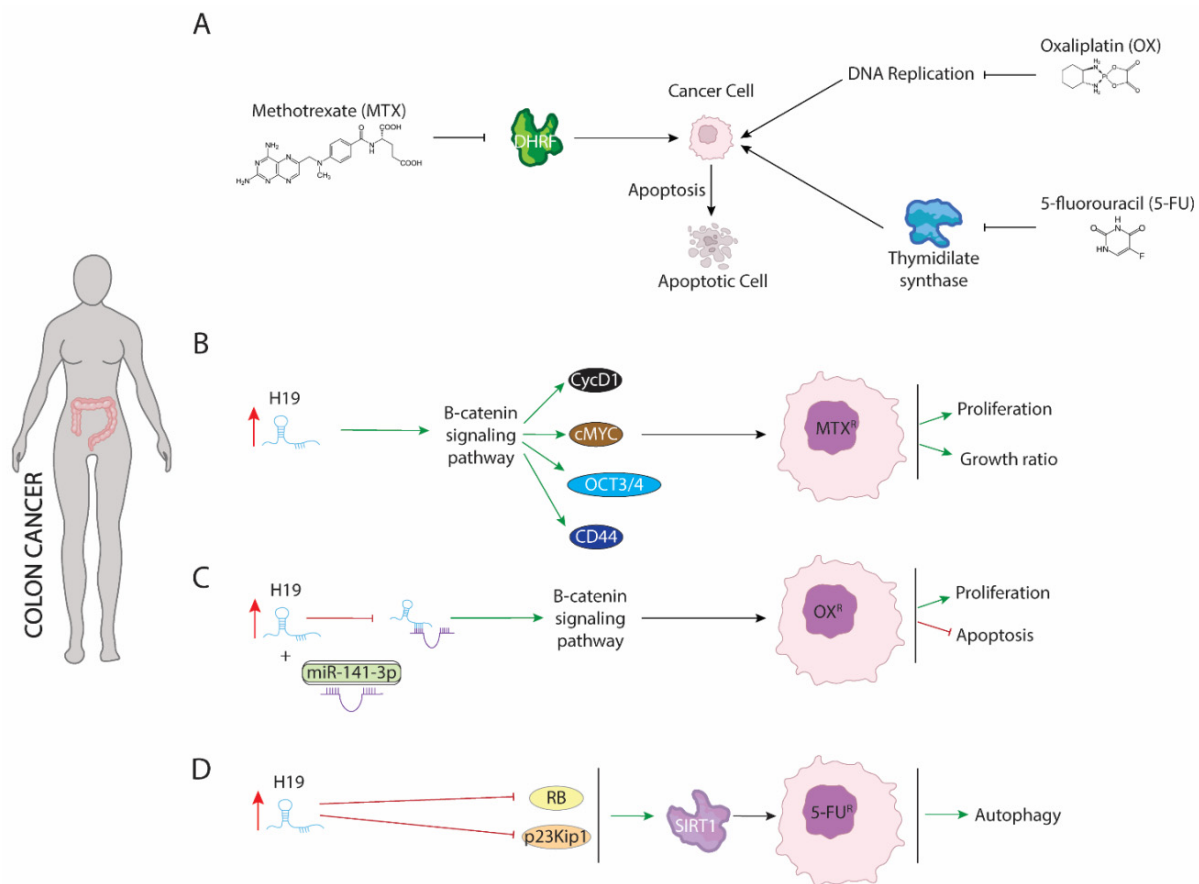


Figure 4. Schematic representation of molecular mechanism dependent of H19 function in colon cancer. **(A)** Mode action of methotrexate (MTX), oxaliplatin (OX), and 5-fluorouracil (5-FU) drugs involved in colon cancer treatment. **(B)** H19 modulate B-catenin signaling pathway genes such as CycD1 or cMYC increasing proliferation and growth ratio. **(C)** H19 acts as a sponge binding to miR-141 increasing expression B-catenin signaling pathway. **(D)** H19 blocking expression of RB and p23Kip1 leading to expression of SIRT1 which in turn, increases autophagy process.

Similar to observed in resistance against MTX, H19 also modulates resistance against oxaliplatin in colorectal cancer cells by activation of the β -catenin signaling pathway. Oxaliplatin (Figure 4A) disrupts DNA replication and transcription by forming intra-strand DNA adducts, but the downstream molecular events underlying the cytotoxic effects of this chemotherapeutic agent have not been well characterized [109]. Activation of β -catenin signaling pathway by H19 is mediated partially binding to miR-141-3p. H19 exerts as competitive sponge preventing miR-141-3p from targeting β -catenin mRNA and thus its degradation (Figure 4C). Curiously, resistance to oxaliplatin treatment is transferred by H19 contained in exosomes to sensitive cells by OXA-resistant cells both in vivo and in vitro colorectal carcinoma [110].

5-fluorouracil (5-FU) is a chemotherapeutic drug used to treat several carcinomas including colorectal cancer. 5-fluorouracil (Figure 4A) acts as an antimetabolite to reducing cell proliferation, by primarily blocking the enzyme thymidilate synthase and disrupting the thymidine formation necessary for DNA synthesis [111,112]. Resistance against 5-FU is dependent on upregulation of H19 (Figure 4D), which in turn reduces expression of retinoblastoma (RB) and p27Kip1-p23Kip1. As a consequence, SIRT1 expression is upregulated and autophagy procedure is activated [113].

6. Discussion and Future Perspectives

The role of lncRNAs in different aspects of carcinogenesis has demonstrated their key involvement in a dual role as promoters of tumorigenesis and tumor suppressor genes. In

the last decade, the role of H19 has been widely described in many carcinomas, demonstrating a bivalent role in the appearance and diagnosis of the disease. The involvement of this lncRNA in the acquisition of resistance to both chemotherapy and radiotherapy has recently been demonstrated, suggesting its possible use as a therapeutic target. In fact, most treatment-resistant carcinomas displayed high H19 levels and H19 overexpression resulted in acquisition of resistance against the different treatments. Furthermore, silencing of this lncRNA makes resistant cells susceptible towards various drugs and ion radiation. Indeed, knockout of H19 in combination with different drug treatment enhanced anti-oncogenic response of malignant cell suggesting that H19 inhibitors could be of application together with current treatments to improve disease progression. Mechanistically, upregulation of H19 protects malignant cells from apoptosis by inducing expression of several antiapoptotic genes such as BCL-2 and multi-resistance drug cancer such as MDR1/2. Additionally, H19 increased autophagy response, which is positively correlated with several drug treatments. Unfortunately, malignant cells resistant to different treatments have the ability to convert surrounding cells into non-sensitive cells by emitting H19 containing exosomes. Taking these data into account, H19 could serve a powerful therapeutic target against several carcinomas to significantly improve prognosis and clinical outcome of patients.

The role of H19 in the acquisition of resistance to both chemotherapy and radiotherapy raises the question of the possibility that other lncRNAs or other elements of the non-coding genome could be exerting similar functions to those identified for H19 in functional gain-of-function assays. It would even be possible that the inhibition and/or overexpression of a certain set of lncRNAs could be considered a more effective treatment than those currently used. Therefore, a more in-depth knowledge on the role of the non-coding genome is critical to find new therapies that allow improving both the prognosis and the clinical outcome of several carcinomas.

Author Contributions: Conceptualization, C.G.-P. and C.L.-S.; writing—original draft preparation, C.G.-P. and C.L.-S.; writing—review and editing, and visualization, C.G.-P., E.L.-V., M.d.M.M.-G., J.M.C.-C., S.C.-C., F.J.M.-A., V.G.-L., A.A., D.F., V.G.-M. and C.L.-S.; supervision, D.F., V.G.-M. and C.L.-S.; project administration, V.G.-M. and C.L.-S.; funding acquisition, V.G.-M. and C.L.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been financed with research grants IB18123 (to C.L.-S.) and GR21174 (to V.G.-M., CTS005) from the Junta de Extremadura, with FEDER co-financing, and CTS-446 (to D.F. and A.A.) from the Junta de Andalucía Regional Council.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Carninci, P.; Kasukawa, T.; Katayama, S.; Gough, J.; Frith, M.C.; Maeda, N.; Oyama, R.; Ravasi, T.; Lenhard, B.; Wells, C.; et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **2005**, *309*, 1559–1563. [[CrossRef](#)]
2. Harrow, J.; Frankish, A.; Gonzalez, J.M.; Tapanari, E.; Diekhans, M.; Kokocinski, F.; Aken, B.L.; Barrell, D.; Zadissa, A.; Searle, S.; et al. GENCODE: The reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* **2012**, *22*, 1760–1774. [[CrossRef](#)]
3. García-Padilla, C.; Aránega, A.; Franco, D. The role of long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *AIMS Genet.* **2018**, *5*, 124–140. [[CrossRef](#)]
4. Expósito-Villén, A.; Aránega, A.E.; Franco, D. Functional Role of Non-Coding RNAs during Epithelial-To-Mesenchymal Transition. *Non-Coding RNA* **2018**, *4*, 14. [[CrossRef](#)]
5. Shi, X.; Sun, M.; Liu, H.; Yao, Y.; Song, Y. Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett.* **2013**, *339*, 159–166. [[CrossRef](#)]
6. Statello, L.; Guo, C.-J.; Chen, L.-L.; Huarte, M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 96–118. [[CrossRef](#)]
7. Scott, M.S.; Ono, M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* **2011**, *93*, 1987–1992. [[CrossRef](#)]

8. Ma, L.; Bajic, V.B.; Zhang, Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* **2013**, *10*, 924–933. [[CrossRef](#)]
9. Singh, S.R.; Rameshwar, P. *MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer*; Springer: New York, NY, USA, 2014.
10. Lu, M.; Zhang, Q.; Deng, M.; Miao, J.; Guo, Y.; Gao, W.; Cui, Q. An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3420. [[CrossRef](#)]
11. Garcia-Padilla, C.; Garcia-Lopez, V.; Aranega, A.; Franco, D.; Garcia-Martinez, V.; Lopez-Sanchez, C. Inhibition of RhoA and Cdc42 by miR-133a Modulates Retinoic Acid Signalling during Early Development of Posterior Cardiac Tube Segment. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4179. [[CrossRef](#)]
12. Garcia-Padilla, C.; Dueñas, A.; Franco, D.; Garcia-Lopez, V.; Aranega, A.; Garcia-Martinez, V.; Lopez-Sanchez, C. Dynamic MicroRNA Expression Profiles During Embryonic Development Provide Novel Insights into Cardiac Sinus Venosus/Inflow Tract Differentiation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *9*, 767954. [[CrossRef](#)]
13. Engreitz, J.M.; Haines, J.E.; Perez, E.M.; Munson, G.; Chen, J.; Kane, M.; McDonel, P.E.; Guttman, M.; Lander, E.S. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *539*, 452–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mathieu, E.L.; Belhocine, M.; Dao, L.T.; Puthier, D.; Spicuglia, S. Functions of lncRNA in development and diseases. *Med. Sci.* **2014**, *30*, 790–796. (In French)
15. García-Padilla, C.; Domínguez, J.N.; Lodde, V.; Munk, R.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M.; Jiménez-Sábado, V.; Ginel, A.; Hove-Madsen, L.; Aránega, A.E.; et al. Identification of atrial-enriched lncRNA Walras linked to cardiomyocyte cytoarchitecture and atrial fibrillation. *FASEB J.* **2022**, *36*, e22051. [[CrossRef](#)]
16. Luo, S.; Lu, J.Y.; Liu, L.; Yin, Y.; Chen, C.; Han, X.; Wu, B.; Xu, R.; Liu, W.; Yuyang, L.J.; et al. Divergent lncRNAs Regulate Gene Expression and Lineage Differentiation in Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 637–652. [[CrossRef](#)]
17. Brannan, C.I.; Dees, E.C.; Ingram, R.S.; Tilghman, S.M. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell Biol.* **1990**, *10*, 28–36. [[CrossRef](#)]
18. Milligan, L.; Forné, T.; Antoine, E.; Weber, M.; Hémonnot, B.; Dandolo, L.; Brunel, C.; Cathala, G. Turnover of primary transcripts is a major step in the regulation of mouse H19 gene expression. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 774–779. [[CrossRef](#)]
19. Schoenfelder, S.; Smits, G.; Fraser, P.; Reik, W.; Paro, R. Non-coding transcripts in the H19 imprinting control region mediate gene silencing in transgenic *Drosophila*. *EMBO Rep.* **2007**, *8*, 1068–1073. [[CrossRef](#)]
20. Zemel, S.; Bartolomei, M.S.; Tilghman, S.M. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Nat. Genet.* **1992**, *2*, 61–65. [[CrossRef](#)]
21. Garcia-Padilla, C.; Domínguez, J.N.; Aránega, A.E.; Franco, D. Differential chamber-specific expression and regulation of long non-coding RNAs during cardiac development. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2019**, *1862*, 194435. [[CrossRef](#)]
22. Wei, Y.; Liu, Z.; Fang, J. H19 functions as a competing endogenous RNA to regulate human epidermal growth factor receptor expression by sequestering let-7c in gastric cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 2600–2606. [[CrossRef](#)]
23. Viereck, J.; Bührke, A.; Foinquinos, A.; Chatterjee, S.; Kleeberger, J.A.; Xiao, K.; Janssen-Peters, H.; Batkai, S.; Ramanujam, D.; Kraft, T.; et al. Targeting muscle-enriched long non-coding RNA H19 reverses pathological cardiac hypertrophy. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 3462–3474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Charalambous, M.; Menhennott, T.R.; Bennett, W.R.; Kelly, S.M.; Dell, G.; Dandolo, L.; Ward, A. An enhancer element at the Igf2/H19 locus drives gene expression in both imprinted and non-imprinted tissues. *Dev. Biol.* **2004**, *271*, 488–497. [[CrossRef](#)]
25. Gabory, A.; Jammes, H.; Dandolo, L. The H19 locus: Role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays* **2010**, *32*, 473–480. [[CrossRef](#)]
26. Lv, J.; Wang, L.; Zhang, J.; Lin, R.; Wang, L.; Sun, W.; Wu, H.; Xin, S. Long noncoding RNA H19-derived miR-675 aggravates restenosis by targeting PTEN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 1154–1161. [[CrossRef](#)]
27. Luo, H.; Wang, J.; Liu, D.; Zang, S.; Ma, N.; Zhao, L.; Zhang, L.; Zhang, X.; Qiao, C. The lncRNA H19/miR-675 axis regulates myocardial ischemic and reperfusion injury by targeting PPAR α . *Mol. Immunol.* **2019**, *105*, 46–54. [[CrossRef](#)]
28. Zhu, L.; Zhu, Y.; Han, S.; Chen, M.; Song, P.; Dai, D.; Xu, W.; Jiang, T.; Feng, L.; Shin, V.Y.; et al. Impaired autophagic degradation of lncRNA ARHGAP5-AS1 promotes chemoresistance in gastric cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 383. [[CrossRef](#)]
29. Dong, H.; Wang, W.; Chen, R.; Zhang, Y.; Zou, K.; Ye, M.; He, X.; Zhang, F.; Han, J. Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **2018**, *53*, 1013–1026. [[CrossRef](#)]
30. Luo, Y.; Zheng, S.; Wu, Q.; Wu, J.; Zhou, R.; Wang, C.; Wu, Z.; Rong, X.; Huang, N.; Sun, L.; et al. Long noncoding RNA (lncRNA) EIF3J-DT induces chemoresistance of gastric cancer via autophagy activation. *Autophagy* **2021**, *17*, 4083–4101. [[CrossRef](#)]
31. Han, P.; Li, J.W.; Zhang, B.M.; Lv, J.C.; Li, Y.M.; Gu, X.Y.; Yu, Z.W.; Jia, Y.H.; Bai, X.F.; Li, L.; et al. The lncRNA CRNDE promotes colorectal cancer cell proliferation and chemoresistance via miR-181a-5p-mediated regulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 9. [[CrossRef](#)]
32. He, W.; Liang, B.; Wang, C.; Li, S.; Zhao, Y.; Huang, Q.; Liu, Z.; Yao, Z.; Wu, Q.; Liao, W.; et al. MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer. *Oncogene* **2019**, *38*, 4637–4654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 339–348. [[CrossRef](#)]
34. Wu, P.; Gao, W.; Su, M.; Nice, E.C.; Zhang, W.; Lin, J.; Xie, N. Adaptive Mechanisms of Tumor Therapy Resistance Driven by Tumor Microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 641469. [[CrossRef](#)]
35. Zheng, H.C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 59950–59964. [[CrossRef](#)]

36. Xiu, M.; Wang, Y.; Li, B.; Wang, X.; Xiao, F.; Chen, S.; Zhang, L.; Zhou, B.; Hua, F. The Role of Notch3 Signaling in Cancer Stemness and Chemoresistance: Molecular Mechanisms and Targeting Strategies. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 694141. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, F.; Wang, H.; Yu, J.; Yao, X.; Yang, S.; Li, W.; Xu, L.; Zhao, L. LncRNA CRNDE attenuates chemoresistance in gastric cancer via SRSF6-regulated alternative splicing of PICALM. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Käsmann, L.; Dietrich, A.; Staab-Weijnitz, C.A.; Manapov, F.; Behr, J.; Rimner, A.; Jeremic, B.; Senan, S.; De Ruyscher, D.; Lauber, K.; et al. Radiation-induced lung toxicity—Cellular and molecular mechanisms of pathogenesis, management, and literature review. *Radiat. Oncol.* **2020**, *15*, 214. [[CrossRef](#)]
39. Gan, L.; Lv, L.; Liao, S. Long non-coding RNA H19 regulates cell growth and metastasis via the miR-22-3p/Snail1 axis in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 2157–2168. [[CrossRef](#)]
40. Wang, J.; Sun, J.; Yang, F. The role of long non-coding RNA H19 in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 7–16. [[CrossRef](#)]
41. Yoshimura, H.; Matsuda, Y.; Yamamoto, M.; Michishita, M.; Takahashi, K.; Sasaki, N.; Ishikawa, N.; Aida, J.; Takubo, K.; Arai, T.; et al. Reduced expression of the H19 long non-coding RNA inhibits pancreatic cancer metastasis. *Lab. Invest.* **2018**, *98*, 814–824. [[CrossRef](#)]
42. Huang, Z.; Chu, L.; Liang, J.; Tan, X.; Wang, Y.; Wen, J.; Chen, J.; Wu, Y.; Liu, S.; Liao, J.; et al. H19 Promotes HCC Bone Metastasis Through Reducing Osteoprotegerin Expression in a Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Alpha/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Manner and Sponging microRNA 200b-3p. *Hepatology* **2021**, *74*, 214–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Xu, H.; Ding, Y.; Yang, X. Overexpression of Long Noncoding RNA H19 Downregulates miR-140-5p and Activates PI3K/AKT Signaling Pathway to Promote Invasion, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition of Ovarian Cancer Cells. *Biomed. Res. Int.* **2021**, *2021*, 6619730. [[CrossRef](#)]
44. Liu, Z.Z.; Tian, Y.F.; Wu, H.; Ouyang, S.Y.; Kuang, W.L. LncRNA H19 promotes glioma angiogenesis through miR-138/HIF-1 α /VEGF axis. *Neoplasma* **2020**, *67*, 111–118. [[CrossRef](#)]
45. Liu, C.; Chen, Z.; Fang, J.; Xu, A.; Zhang, W.; Wang, Z. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 263–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Shermene Lim, Y.W.; Xiang, X.; Garg, M.; Le, M.T.; Li-Ann Wong, A.; Wang, L.; Goh, B.C. The double-edged sword of H19 lncRNA: Insights into cancer therapy. *Cancer Lett.* **2021**, *500*, 253–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Alipoor, B.; Parvar, S.N.; Sabati, Z.; Ghaedi, H.; Ghasemi, H. An updated review of the H19 lncRNA in human cancer: Molecular mechanism and diagnostic and therapeutic importance. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 6357–6374. [[CrossRef](#)]
48. Katsura, C.; Ogunmwonyi, I.; Kankam, H.K.; Saha, S. Breast cancer: Presentation, investigation and management. *Br. J. Hosp. Med.* **2022**, *83*, 1–7. [[CrossRef](#)]
49. Arciero, C.A.; Guo, Y.; Jiang, R.; Behera, M.; O'Regan, R.; Peng, L.; Li, X. ER+/HER2+ Breast Cancer Has Different Metastatic Patterns and Better Survival Than ER-/HER2+ Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **2019**, *19*, 236–245. [[CrossRef](#)]
50. Keenan, T.E.; Tolaney, S.M. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2020**, *18*, 479–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Belachew, E.B.; Sewasew, D.T. Molecular Mechanisms of Endocrine Resistance in Estrogen-Positive Breast Cancer. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 599586. [[CrossRef](#)]
52. Fisusi, F.A.; Akala, E.O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm. Nanotechnol.* **2019**, *7*, 3–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mills, J.N.; Rutkovsky, A.C.; Giordano, A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: Overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *41*, 59–65. [[CrossRef](#)]
54. Shafei, A.; El-Bakly, W.; Sobhy, A.; Wagdy, O.; Reda, A.; Aboelenin, O.; Marzouk, A.; El Habak, K.; Mostafa, R.; Ali, M.A.; et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 1209–1218. [[CrossRef](#)]
55. Abu Samaan, T.M.; Samec, M.; Liskova, A.; Kubatka, P.; Büsselberg, D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules* **2019**, *9*, 789. [[CrossRef](#)]
56. Hsu, M.Y.; Hsieh, C.H.; Huang, Y.T.; Chu, S.Y.; Chen, C.M.; Lee, W.J.; Liu, S.J. Enhanced Paclitaxel Efficacy to Suppress Triple-Negative Breast Cancer Progression Using Metronomic Chemotherapy with a Controlled Release System of Electrospun Poly-d-l-Lactide-Co-Glycolide (PLGA) Nanofibers. *Cancers* **2021**, *13*, 3350. [[CrossRef](#)]
57. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer.* **2010**, *10*, 194–204; Erratum in *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Jabbarzadeh Kaboli, P.; Salimian, F.; Aghapour, S.; Xiang, S.; Zhao, Q.; Li, M.; Wu, X.; Du, F.; Zhao, Y.; Shen, J.; et al. Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer—A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy. *Pharmacol. Res.* **2020**, *156*, 104806. [[CrossRef](#)]
59. Si, X.; Zang, R.; Zhang, E.; Liu, Y.; Shi, X.; Zhang, E.; Shao, L.; Li, A.; Yang, N.; Han, X.; et al. LncRNA H19 confers chemoresistance in ER α -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget* **2016**, *7*, 81452–81462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Pandya, V.; Glubrecht, D.; Vos, L.; Hanson, J.; Damaraju, S.; Mackey, J.; Hugh, J.; Goping, I.S. The pro-apoptotic paradox: The BH3-only protein Bcl-2 interacting killer (Bik) is prognostic for unfavorable outcomes in breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 33272–33285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Yan, L.; Yang, S.; Yue, C.X.; Wei, X.Y.; Peng, W.; Dong, Z.Y.; Xu, H.N.; Chen, S.L.; Wang, W.R.; Chen, C.J.; et al. Long noncoding RNA H19 acts as a miR-340-3p sponge to promote epithelial-mesenchymal transition by regulating YWHAZ expression in paclitaxel-resistant breast cancer cells. *Environ. Toxicol.* **2020**, *35*, 1015–1028. [[CrossRef](#)]
62. Han, J.; Han, B.; Wu, X.; Hao, J.; Dong, X.; Shen, Q.; Pang, H. Knockdown of lncRNA H19 restores chemo-sensitivity in paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer through triggering apoptosis and regulating Akt signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *359*, 55–61. [[CrossRef](#)]
63. Thorn, C.F.; Oshiro, C.; Marsh, S.; Hernandez-Boussard, T.; McLeod, H.; Klein, T.E.; Altman, R.B. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharm. Genom.* **2011**, *21*, 440–446. [[CrossRef](#)]
64. Zhu, Q.N.; Wang, G.; Guo, Y.; Peng, Y.; Zhang, R.; Deng, J.L.; Li, Z.X.; Zhu, Y.S. LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 91990–92003. [[CrossRef](#)]
65. Wang, Y.; Zhou, P.; Li, P.; Yang, F.; Gao, X.Q. Long non-coding RNA H19 regulates proliferation and doxorubicin resistance in MCF-7 cells by targeting PARP1. *Bioengineered* **2020**, *11*, 536–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Saucedo-Cuevas, L.P.; Ruppen, I.; Ximénez-Embún, P.; Domingo, S.; Gayarre, J.; Muñoz, J.; Silva, J.M.; García, M.J.; Benítez, J. CUL4A contributes to the biology of basal-like breast tumors through modulation of cell growth and antitumor immune response. *Oncotarget* **2014**, *5*, 2330–2343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Haque, A.; Sait, K.H.W.; Alam, Q.; Alam, M.Z.; Anfinan, N.; Wali, A.W.N.; Rasool, M. MDR1 Gene Polymorphisms and Its Association with Expression as a Clinical Relevance in Terms of Response to Chemotherapy and Prognosis in Ovarian Cancer. *Front. Genet.* **2020**, *11*, 516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yang, M.; Li, H.; Li, Y.; Ruan, Y.; Quan, C. Identification of genes and pathways associated with MDR in MCF-7/MDR breast cancer cells by RNA-seq analysis. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 6211–6226. [[CrossRef](#)]
69. Martin, H.L.; Smith, L.; Tomlinson, D.C. Multidrug-resistant breast cancer: Current perspectives. *Breast Cancer* **2014**, *6*, 1–13. [[CrossRef](#)]
70. Pignochino, Y.; Capozzi, F.; D’Ambrosio, L.; Dell’Aglia, C.; Basiricò, M.; Canta, M.; Lorenzato, A.; Vignolo Lutati, F.; Aliberti, S.; Palesandro, E.; et al. PARP1 expression drives the synergistic antitumor activity of trabectedin and PARP1 inhibitors in sarcoma preclinical models. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 86. [[CrossRef](#)]
71. Weaver, A.N.; Yang, E.S. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 290. [[CrossRef](#)]
72. Takagi, M.; Ogawa, C.; Aoki-Nogami, Y.; Iehara, T.; Ishibashi, E.; Imai, M.; Kihara, T.; Nobori, K.; Hasebe, K.; Mizutani, S.; et al. Phase I clinical study of oral olaparib in pediatric patients with refractory solid tumors: Study protocol. *BMC Pediatrics* **2019**, *19*, 31. [[CrossRef](#)]
73. Wang, X.; Pei, X.; Guo, G.; Qian, X.; Dou, D.; Zhang, Z.; Xu, X.; Duan, X. Exosome-mediated transfer of long noncoding RNA H19 induces doxorubicin resistance in breast cancer. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 6896–6904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Elledge, R.M.; Lock-Lim, S.; Allred, D.C.; Hilsenbeck, S.G.; Corder, L. p53 mutation and tamoxifen resistance in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 1203–1208.
75. Brett, J.O.; Spring, L.M.; Bardia, A.; Wander, S.A. ESR1 mutation as an emerging clinical biomarker in metastatic hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2021**, *23*, 85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Riggins, R.B.; Schrecengost, R.S.; Guerrero, M.S.; Bouton, A.H. Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett.* **2007**, *256*, 1–24. [[CrossRef](#)]
77. Zhu, Y.; Liu, Y.; Zhang, C.; Chu, J.; Wu, Y.; Li, Y.; Liu, J.; Li, Q.; Li, S.; Shi, Q.; et al. Tamoxifen-resistant breast cancer cells are resistant to DNA-damaging chemotherapy because of upregulated BARD1 and BRCA1. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1595. [[CrossRef](#)]
78. Wang, J.; Xie, S.; Yang, J.; Xiong, H.; Jia, Y.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Ying, X.; Chen, C.; Ye, C.; et al. The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 81. [[CrossRef](#)]
79. Gao, H.; Hao, G.; Sun, Y.; Li, L.; Wang, Y. Long noncoding RNA H19 mediated the chemosensitivity of breast cancer cells via Wnt pathway and EMT process. *Oncol. Targets Ther.* **2018**, *11*, 8001–8012. [[CrossRef](#)]
80. Matsuda, N.; Lim, B.; Wang, X.; Ueno, N.T. Early clinical development of epidermal growth factor receptor targeted therapy in breast cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26*, 463–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Xu, B.; Huo, Z.; Huang, H.; Ji, W.; Bian, Z.; Jiao, J.; Sun, J.; Shao, J. The expression and prognostic value of the epidermal growth factor receptor family in glioma. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 451. [[CrossRef](#)]
82. Grapa, C.M.; Mocan, T.; Gonciar, D.; Zdrehus, C.; Mosteanu, O.; Pop, T.; Mocan, L. Epidermal Growth Factor Receptor and Its Role in Pancreatic Cancer Treatment Mediated by Nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *14*, 9693–9706. [[CrossRef](#)]
83. Du, Z.; Brown, B.P.; Kim, S.; Ferguson, D.; Pavlick, D.C.; Jayakumaran, G.; Benayed, R.; Gallant, J.N.; Zhang, Y.K.; Yan, Y.; et al. Structure-function analysis of oncogenic EGFR Kinase Domain Duplication reveals insights into activation and a potential approach for therapeutic targeting. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1382. [[CrossRef](#)]
84. Jänne, P.A.; Engelman, J.A.; Johnson, B.E. Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: Implications for treatment and tumor biology. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 3227–3234. [[CrossRef](#)]
85. Chen, G.; Kronenberger, P.; Teugels, E.; Umelo, I.A.; De Grève, J. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells: The effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. *BMC Med.* **2012**, *10*, 28. [[CrossRef](#)]
86. Piperdi, B.; Perez-Soler, R. Role of erlotinib in the treatment of non-small cell lung cancer: Clinical outcomes in wild-type epidermal growth factor receptor patients. *Drugs* **2012**, *72* (Suppl. S1), 11–19. [[CrossRef](#)]

87. Nurwidya, F.; Takahashi, F.; Takahashi, K. Gefitinib in the treatment of nonsmall cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* **2016**, *7*, 119–123. [[CrossRef](#)]
88. Chen, C.; Liu, W.R.; Zhang, B.; Zhang, L.M.; Li, C.G.; Liu, C.; Zhang, H.; Huo, Y.S.; Ma, Y.C.; Tian, P.F.; et al. LncRNA H19 downregulation confers erlotinib resistance through upregulation of PKM2 and phosphorylation of AKT in EGFR-mutant lung cancers. *Cancer Lett.* **2020**, *486*, 58–70. [[CrossRef](#)]
89. Pan, R.; Zhou, H. Exosomal Transfer of lncRNA H19 Promotes Erlotinib Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer via miR-615-3p/ATG7 Axis. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 4283–4297. [[CrossRef](#)]
90. Zhang, P.; Ling, L.; Zheng, Z.; Zhang, Y.; Wang, R.; Wu, M.; Zhang, N.; Hu, M.; Yang, X. ATG7-dependent and independent autophagy determine the type of treatment in lung cancer. *Pharmacol. Res.* **2021**, *163*, 105324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Cho, K.J.; Shin, S.Y.; Moon, H.; Kim, B.K.; Ro, S.W. Knockdown of Atg7 suppresses Tumorigenesis in a murine model of liver cancer. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101158. [[CrossRef](#)]
92. Zhou, Y.; Zhang, Y. Inhibition of lncRNA H19 has the effect of anti-tumour and enhancing sensitivity to Gefitinib and Chemotherapy in Non-small-cell lung cancer in vivo. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 5811–5816. [[CrossRef](#)]
93. Cappuzzo, F.; Gregorc, V.; Rossi, E.; Cancellieri, A.; Magrini, E.; Paties, C.T.; Ceresoli, G.; Lombardo, L.; Bartolini, S.; Calandri, C.; et al. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): Analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2658–2663. [[CrossRef](#)]
94. Huang, Z.; Ma, Y.; Zhang, P.; Si, J.; Xiong, Y.; Yang, Y. Long non-coding RNA H19 confers resistance to gefitinib via miR-148b-3p/DDAH1 axis in lung adenocarcinoma. *Anticancer Drugs* **2020**, *31*, 44–54. [[CrossRef](#)]
95. Lei, Y.; Guo, W.; Chen, B.; Chen, L.; Gong, J.; Li, W. Tumor-released lncRNA H19 promotes gefitinib resistance via packaging into exosomes in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 3438–3446. [[CrossRef](#)]
96. Zhao, X.; Jin, X.; Zhang, Q.; Liu, R.; Luo, H.; Yang, Z.; Geng, Y.; Feng, S.; Li, C.; Wang, L.; et al. Silencing of the lncRNA H19 enhances sensitivity to X-ray and carbon-ions through the miR-130a-3p /WNK3 signaling axis in NSCLC cells. *Cancer Cell Int.* **2021**, *21*, 644. [[CrossRef](#)]
97. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)]
98. Friedman, H.S.; Kerby, T.; Calvert, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2585–2597.
99. Duan, S.; Li, M.; Wang, Z.; Wang, L.; Liu, Y. H19 induced by oxidative stress confers temozolomide resistance in human glioma cells via activating NF- κ B signaling. *Oncol. Targets Ther.* **2018**, *11*, 6395–6404. [[CrossRef](#)]
100. Chien, C.H.; Hsueh, W.T.; Chuang, J.Y.; Chang, K.Y. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *J. Biomed. Sci.* **2021**, *28*, 18. [[CrossRef](#)]
101. Campbell, K.J.; Tait, S. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol.* **2018**, *8*, 180002. [[CrossRef](#)]
102. Fang, W.; Che, X.; Li, G.; Wang, A.; Wang, Y.; Shi, X.; Hou, K.; Zhang, X.; Qu, X.; Liu, Y. Sur-X, a novel peptide, kills colorectal cancer cells by targeting survivin-XIAP complex. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 82. [[CrossRef](#)]
103. Montalto, F.I.; De Amicis, F. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells* **2020**, *9*, 2648. [[CrossRef](#)]
104. Fu, B.; Zhang, A.; Li, M.; Pan, L.; Tang, W.; An, M.; Liu, W.; Zhang, J. Circular RNA profile of breast cancer brain metastasis: Identification of potential biomarkers and therapeutic targets. *Epigenomics* **2018**, *10*, 1619–1630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Jiang, P.; Wang, P.; Sun, X.; Yuan, Z.; Zhan, R.; Ma, X.; Li, W. Knockdown of long noncoding RNA H19 sensitizes human glioma cells to temozolomide therapy. *Oncol. Targets Ther.* **2016**, *9*, 3501–3509. [[CrossRef](#)]
106. Kuang, Y.; Bing, Z.; Jin, X.; Li, Q. LncRNA H19 Upregulation Participates in the Response of Glioma Cells to Radiation. *Biomed. Res. Int.* **2021**, *2021*, 1728352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Wu, K.F.; Liang, W.C.; Feng, L.; Pang, J.X.; Waye, M.M.; Zhang, J.F.; Fu, W.M. H19 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer through activating Wnt/ β -catenin pathway. *Exp. Cell Res.* **2017**, *350*, 312–317. [[CrossRef](#)]
108. Singh, R.; Fouladi-Nashta, A.A.; Li, D.; Halliday, N.; Barrett, D.A.; Sinclair, K.D. Methotrexate induced differentiation in colon cancer cells is primarily due to purine deprivation. *J. Cell Biochem.* **2006**, *99*, 146–155. [[CrossRef](#)]
109. Raimondi, M.V.; Randazzo, O.; La Franca, M.; Barone, G.; Vignoni, E.; Rossi, D.; Collina, S. DHFR Inhibitors: Reading the Past for Discovering Novel Anticancer Agents. *Molecules* **2019**, *24*, 1140. [[CrossRef](#)]
110. Arango, D.; Wilson, A.J.; Shi, Q.; Corner, G.A.; Arañes, M.J.; Nicholas, C.; Lesser, M.; Mariadason, J.M.; Augenlicht, L.H. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer* **2004**, *91*, 1931–1946. [[CrossRef](#)]
111. Ren, J.; Ding, L.; Zhang, D.; Shi, G.; Xu, Q.; Shen, S.; Wang, Y.; Wang, T.; Hou, Y. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics* **2018**, *8*, 3932–3948. [[CrossRef](#)]
112. Vodenkova, S.; Buchler, T.; Cervena, K.; Veskrnova, V.; Vodicka, P.; Vymetalkova, V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *206*, 107447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Yokoyama, Y.; Sakatani, T.; Wada, R.; Ishino, K.; Kudo, M.; Koizumi, M.; Yamada, T.; Yoshida, H.; Naito, Z. In vitro and in vivo studies on the association of long non-coding RNAs H19 and urothelial cancer associated 1 with the susceptibility to 5-fluorouracil in rectal cancer. *Int. J. Oncol.* **2019**, *55*, 1361–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]