

Knockdown do RNA Longo Não Codificante ZEB1-AS1 Acelera a Hipertrofia Cardíaca pela Via miR-186-5p/HDAC2

Knockdown of the Long Noncoding RNA ZEB1-AS1 Accelerates Cardiac Hypertrophy via the miR-186-5p/HDAC2 Pathway

Bingfeng Cao,¹ Qingxia Liu,² Xiaoyuan Zhang,¹ Yufeng Wang¹

Department of Cardiology – Weihai Central Hospital,¹ Shandong – China

Department of Outpatient – Weihai Central Hospital,² Shandong – China

Resumo

Fundamento: O papel do RNA longo não codificante ZEB1-AS1 na hipertrofia cardíaca (HC) permanece incerto.

Objetivos: Investigar a função do ZEB1-AS1 no desenvolvimento e na progressão da HC, bem como elucidar seu mecanismo molecular subjacente.

Métodos: Os níveis de expressão de RNA foram quantificados por PCR quantitativa em tempo real. A área de superfície das células AC16 foi avaliada por coloração por imunofluorescência. A expressão proteica foi analisada por *Western blotting*. As interações entre RNAs foram examinadas por ensaios com repórter de luciferase e por imunoprecipitação de RNA. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados: A expressão de ZEB1-AS1 esteve aumentada em tecidos miocárdicos e em células AC16 estimuladas com isoproterenol (ISO). O *knockdown* de ZEB1-AS1 atenuou as respostas hipertróficas induzidas por ISO. Mecanicamente, ZEB1-AS1 modulou a expressão de desacetilase de histonas 2 (HDAC2) atuando como “esponja molecular” para miR-186-5p. De forma consistente, o *knockdown* de ZEB1-AS1 reduziu a HDAC2 e diminuiu a expressão de marcadores hipertróficos, incluindo o peptídeo natriurético tipo B, o peptídeo natriurético atrial e a cadeia pesada de miosina β , restringindo assim a progressão da HC.

Conclusões: ZEB1-AS1 encontra-se superexpresso em tecidos miocárdicos e em células AC16 estimuladas com ISO. Nossos achados indicam que o eixo ZEB1-AS1/miR-186-5p/HDAC2 contribui para a HC, oferecendo uma base mecânica e um potencial alvo terapêutico para intervenção clínica.

Palavras-chave: Cardiomegalia; RNA Longo não Codificante; Histona Desacetilase 2.

Abstract

Background: The role of the long noncoding RNA ZEB1-AS1 in cardiac hypertrophy (CH) remains unclear.

Objectives: To investigate the function of ZEB1-AS1 in the development and progression of CH as well as elucidate its underlying molecular mechanism.

Methods: RNA expression levels were quantified by quantitative real-time PCR. Surface area of AC16 cells was assessed by immunofluorescence staining. Protein expression was evaluated by Western blotting. Interactions among RNAs were examined using luciferase reporter assays and RNA immunoprecipitation. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results: The expression of ZEB1-AS1 was upregulated in myocardial tissues and in isoproterenol (ISO)-stimulated AC16 cells. The knockdown of ZEB1-AS1 mitigated ISO-induced hypertrophic responses. Mechanistically, ZEB1-AS1 modulated histone deacetylase 2 (HDAC2) expression by acting as a molecular sponge for miR-186-5p. Consistently, the knockdown of ZEB1-AS1 reduced HDAC2 and decreased the expression of hypertrophic markers, including B-type natriuretic peptide, atrial natriuretic peptide, and β -myosin heavy chain, thereby restraining the progression of CH.

Conclusions: ZEB1-AS1 is upregulated in myocardial tissues and ISO-stimulated AC16 cells. Our findings indicate the ZEB1-AS1/miR-186-5p/HDAC2 axis contributes to CH, providing a mechanistic basis and potential therapeutic target for clinical intervention.

Keywords: Cardiomegaly; Long Noncoding RNA; Histone Deacetylase 2.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>

Correspondência: Yufeng Wang •

Department of Cardiology, Weihai Central Hospital, No. 3 Mishan East Road West, Weihai, 264400, Shandong - China

E-mail: cbf_1978@126.com, bgf70@163.com

Artigo recebido em 25/10/2025, revisado em 25/04/2025, aceito em 28/07/2025

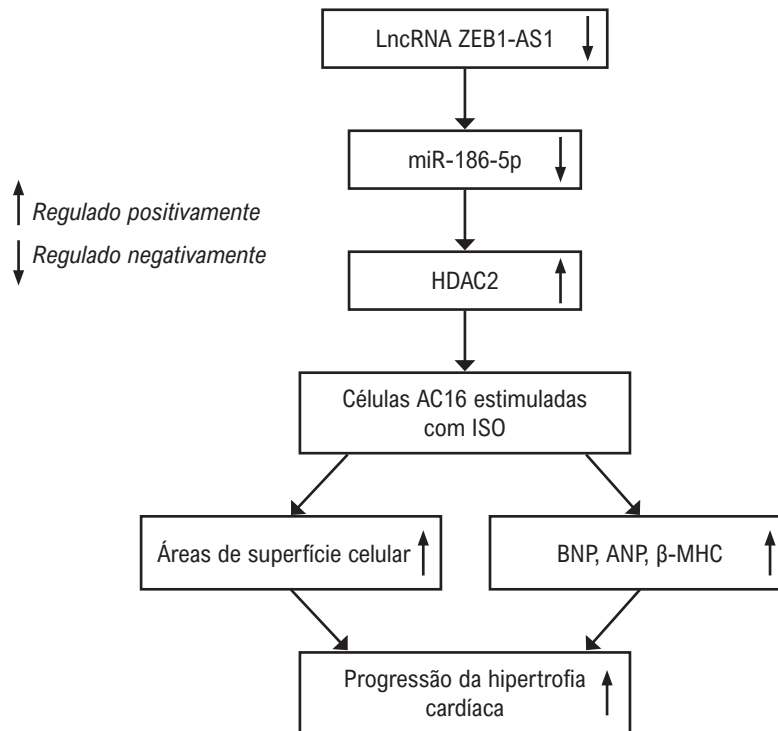
Editor responsável pela revisão: Natália Olivetti

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20240703>

Figura Central: Knockdown do RNA Longo Não Codificante ZEB1-AS1 Acelera a Hipertrofia Cardíaca pela Via miR-186-5p/HDAC2



ABC Cardiol
Arquivos Brasileiros de Cardiologia



Arq Bras Cardiol. 2025; 122(11):e20240703

Knockdown do RNA Longo Não Codificante ZEB1-AS1 Acelera a Hipertrofia Cardíaca Pela Via miR-186-5p/HDAC2. ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético tipo B; β-MHC: cadeia pesada de miosina β; HDAC2: desacetilase de histonas 2; ISO: isoproterenol; LncRNA: RNA longo não codificante.

Introdução

A hipertrofia cardíaca (HC) caracteriza-se pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos, e não pelo aumento de seu número. Trata-se, principalmente, de uma resposta compensatória ao estresse biomecânico, destinada a preservar o débito cardíaco e manter a homeostase fisiológica.^{1,2} A HC é amplamente classificada como patológica ou fisiológica. A HC patológica associa-se comumente à apoptose de cardiomiócitos, fibrose miocárdica, arquitetura celular desorganizada, alterações epigenéticas e reativação aberrante de programas gênicos fetais, incluindo os marcadores peptídeo natriurético tipo B (BNP), peptídeo natriurético atrial (ANP) e cadeia pesada de miosina β (β-MHC).³⁻⁵ A persistência da HC patológica pode levar a desfechos clínicos graves, como arritmia, remodelamento cardíaco maladaptativo, insuficiência cardíaca (IC), infarto do miocárdio e morte súbita cardíaca.^{6,7} Apesar dos avanços terapêuticos, os desfechos — particularmente na IC relacionada à HC — permanecem subótimos, com cerca de 50% de sobrevida em 5 anos após o diagnóstico.⁸ Elucidar os mecanismos moleculares que impulsionam o desenvolvimento e a progressão da HC é, portanto, uma prioridade de pesquisa.

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) — incluindo RNAs circulares (circRNAs), RNAs longos não codificantes (lncRNAs) e micro RNAs (miRNAs) — têm atraído considerável atenção por seus papéis em diversos processos regulatórios, principalmente por meio da modulação da expressão de RNAs codificadores de proteína.⁹⁻¹³ Os lncRNAs, definidos como transcritos não codificadores com ≥ 200 nucleotídeos e sem capacidade de codificação proteica, emergiram como reguladores-chave em um amplo espectro de condições patológicas.^{14,15} Numerosos estudos mostram que lncRNAs contribuem para a patogênese de doenças como nefropatia diabética,¹⁶ hipertensão pulmonar,¹⁷ neoplasias malignas¹⁸ e doenças cardiovasculares.¹⁹⁻²¹ Evidências crescentes também implicam lncRNAs no desenvolvimento e na progressão da HC. Por exemplo, o silenciamento do lncRNA TUG1 atenua a HC ao modular a via miR-497/MEF2C,²² o ncRNA PVT1 promove a HC patológica atuando como esponja molecular para miR-196b²³ e o lncRNA NEAT1 acelera a HC por meio do eixo miR-19a-3p/SMYD2.²⁴ O RNA longo não codificante ZEB1-AS1 (lncRNA ZEB1-AS1), um lncRNA recentemente identificado e inicialmente estudado

Artigo Original

em câncer, tem sido implicado em múltiplos processos patológicos;²⁵ contudo, seu papel na HC permanece amplamente indefinido.

Os miRNAs constituem uma classe de ncRNAs curtos e altamente conservados (tipicamente > 22 nucleotídeos [nt]) que reprimem a expressão de mRNAs-alvo.²⁶ O miR-186-5p é um miRNA bem caracterizado envolvido na regulação de várias doenças humanas, incluindo condições cardiovasculares.²⁷⁻²⁹ Entretanto, seu papel específico na HC ainda não é bem compreendido. A desacetilase de histonas 2 (HDAC2), membro da família de desacetilases de histonas, tem sido implicada em diversos estados patológicos, incluindo HC.³⁰⁻³² Resta determinar se o eixo regulatório miR-186-5p/HDAC2 participa da progressão da HC mediada por ZEB1-AS1.

Este estudo teve como objetivo investigar o papel do ZEB1-AS1 no desenvolvimento e na progressão da HC e delinear seu mecanismo subjacente, a fim de identificar um potencial alvo terapêutico.

Métodos

Espécimes de tecido cardíaco humano

Coletamos amostras de tecido cardíaco de 20 pacientes com hipertrofia ventricular esquerda (HVE) — secções de coração obtidas durante transplante cardíaco — e de 10 corações de doadores sem histórico de doença cardíaca, em nosso hospital, entre março de 2018 e setembro de 2023. A Tabela 1 resume as características clínicas de pacientes e doadores.

Os critérios de inclusão para HVE foram espessura do septo interventricular em diástole e/ou espessura da parede posterior do VE $\geq 1,2$ cm, com fração de ejeção do VE > 40% à ecocardiografia. Critérios de exclusão incluíram IC sistólica, neoplasia, infecção aguda, BNP > 400 ng/L, doença de Parkinson, fibrose pulmonar idiopática, choque,

cirrose hepática ou tratamento recente com interferon ou fenobarbital.³³ Os corações de doadores eram provenientes de indivíduos falecidos por causas não cardíacas; os tecidos foram coletados entre 0,5 e 6 h pós-morte. Todas as amostras de tecido cardíaco foram imediatamente congeladas por *snap-freezing* em nitrogênio líquido (Delun, Xangai, China) antes da extração de RNA.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional de nosso hospital, e todos os participantes forneceram consentimento informado. Os procedimentos de pesquisa aderiram aos princípios da revisão de 2024 da Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial.³⁴

Cultura celular e transfecção

A linhagem de cardiomiócitos humanos AC16 foi obtida da American Type Culture Collection (EUA). As células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; HyClone Laboratories, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, EUA) e mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com 5% de CO₂. Para estabelecer um modelo in vitro de HC, células AC16 foram tratadas com 10 μ mol/L de isoproterenol (ISO; Sigma-Aldrich, EUA), conforme protocolos publicados.³⁵

Os construtos *short hairpin RNA-negative control* (sh-NC) e sh-ZEB1-AS1 foram obtidos da GeneChem (Xangai, China). *Mimics* de miR-186-5p, um inibidor de miR-186-5p e seus respectivos controles negativos foram adquiridos da RiboBio (Guangzhou, China). As transfecções celulares foram realizadas com Lipofectamine 3000 (Sigma-Aldrich, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

PCR quantitativa em tempo real

O RNA total foi extraído de amostras de tecido cardíaco humano e de células AC16 usando o reagente TRIzol (Sigma-Aldrich, EUA). A síntese de cDNA e a amplificação foram realizadas com SYBR Green Master Mix (Takara,

Tabela 1 – Sequências de primers utilizadas no qRT-PCR

Gene	Forward (5' $\rightarrow$ 3')	Reverse (5' $\rightarrow$ 3')
ZEB1-AS1	5'-CCGTGGGCACTGCTGAAT-3'	5'-CTGCTGGCAAGCGGAAC-3'
miR-186-5p	5'-CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU-3'	5'-CCCAAAGGAGAAUUCUUUGUU-3'
HDAC2	5'-TGAGATCCCAATGAGTTGCCA-3'	5'-TACTGACATCTGGTCAGACA-3'
ANP	5'-CAACGCAGA-CCTGATGGATTT-3'	5'-AGCCCCCGC-TTCTTCATT-3'
BNP	5'-TGGAACGTCGGGTACAG-3'	5'-CTGATCCGGTCCATCTTCCT-3'
β -MHC	5'-CCGAGTCCAGGTCAACAA-3'	5'-CTTCACGGGCACCTTGA-3'
U6	5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT-3'	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCT-3'
GAPDH	5'-CCATCAACGACCCCTTCATT-3'	5'-GACCAGCTTCCATTCTCAG-3'

ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético tipo B; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; HDAC2: histone deacetylase 2; miR-186-5p: microRNA-186-5p; qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; U6: RNA nuclear pequeno U6; ZEB1-AS1: zinc finger E-box binding homeobox 1 antisense RNA 1; β -MHC: cadeia pesada de miosina β .

Japão), conforme instruções do fabricante. GAPDH e U6 serviram como controles endógenos para normalização da expressão de lncRNA/mRNA e miRNA, respectivamente. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A Tabela 2 apresenta as sequências de primers utilizadas no qRT-PCR.

Western blotting

A extração de proteínas de células AC16 foi realizada conforme descrito anteriormente.³⁶ Em resumo, as células foram lisadas em tampão *radioimmunoprecipitation assay* e as proteínas foram desnaturadas por fervura. Quantidades iguais de proteína foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF; Millipore, EUA). As membranas foram bloqueadas com 1% de albumina sérica bovina (BSA) por 1 h à temperatura ambiente e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As blots foram incubadas a 4 °C, durante a noite, com anticorpos primários contra ANP (1:2000, Abcam, EUA), BNP (1:2000, CST, EUA), β -MHC (1:2000, CST, EUA) e GAPDH (1:2000, Abcam, EUA). Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:10.000, Jackson, EUA) por 2 h à temperatura ambiente. As bandas foram visualizadas por quimioluminescência aprimorada (Amersham, Reino Unido) e quantificadas no ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

Coloração por imunofluorescência

Células AC16 foram fixadas com paraformaldeído a 4% a 37 °C por 30 min, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% por 15 min. As células foram bloqueadas por 30 min em soro normal de cabra a 10% com 1% de BSA (Sigma-Aldrich) e incubadas, no escuro, durante a noite a 4 °C, com anticorpo primário anti- β -actina (Abcam, EUA) diluído no tampão de bloqueio. Após três lavagens em PBS, as células foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado por 2 h a 37 °C, contracoradas com DAPI e imageadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss). A área de superfície celular foi quantificada no ImageJ.

Ensaio repórter de dupla luciferase

Sequências de ligação para miR-186-5p em ZEB1-AS1 e na 3'-RNT de HDAC2 foram clonadas em vetores pGL3-Basic (LMAI Bio, Xangai, China). Células AC16 foram cotransfectadas com *mimic* controle negativo ou *mimic* de miR-186-5p juntamente com construções repórter *wild type* (WT) ou mutantes (MUT). Após a transfecção, as células foram coletadas e a atividade de luciferase foi medida com o *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, EUA).

Imunoprecipitação de RNA

A imunoprecipitação de RNA (RIP) foi realizada com o *RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit* (Millipore, EUA) para avaliar as interações entre ZEB1-AS1, miR-186-5p

Tabela 2 – Características clínicas de doadores saudáveis e pacientes com HVE

Variável	Saudáveis (n = 10)	HVE (n = 20)	Valor p
Idade (anos)	67 ± 8	68 ± 12	0,8141
Masculino/feminino (n/n)	4/6	11/9	0,4390
Tabagismo, n (%)	4 (40%)	11 (55%)	0,4390
DM, n (%)	3 (30%)	12 (60%)	0,1210
Hipertensão, n (%)	4 (40%)	18 (90%)	0,0040
SCA, n (%)	2 (20%)	14 (70%)	0,0100
FA, n (%)	0 (0%)	5 (25%)	0,0830
Glicose em jejum (mmol/L)	5,51 ± 0,54	6,23 ± 1,85	0,2417
PAS (mmHg)	115,25 ± 18,25	159,91 ± 28,24	0,0001
PAD (mmHg)	73,52 ± 12,25	95,41 ± 15,36	0,0005
HDL-C (mmol/L)	1,36 ± 0,11	1,15 ± 0,29	0,0365
LDL-C (mmol/L)	2,61 ± 0,56	3,05 ± 0,81	0,1354
BNP (ng/L)	129,61 ± 74,12	158,36 ± 95,21	0,4112
FE (%)	78,55 ± 5,81	58,25 ± 6,25	0,0001
Diâmetro do VE (cm)	4,25 ± 0,45	4,38 ± 0,66	0,5807
DDFVE (cm)	4,55 ± 0,50	4,99 ± 0,91	0,1673
EIVd (cm)	0,98 ± 0,08	1,24 ± 0,13	0,0001
EPPVEd (cm)	0,95 ± 0,12	1,29 ± 0,12	0,0001
ZEB1-AS1 relativo (média ± DP)	0,895 ± 0,394	2,194 ± 0,633	0,0001

BNP: peptídeo natriurético tipo B; DDFVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DM: diabetes melito; EIVd: espessura do septo interventricular em diástole; EPPVEd: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole; FA: fibrilação atrial; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; HDL-C: colesterol de lipoproteína de alta densidade; HVE: hipertrofia do ventrículo esquerdo; LDL-C: colesterol de lipoproteína de baixa densidade; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; SCA: síndrome coronariana aguda.

e HDAC2, conforme instruções do fabricante. Em resumo, as células foram lisadas em tampão de lise RIP e incubadas com esferas magnéticas conjugadas a anti-Argonaute-2 (Ago2; Abcam, EUA) ou IgG de coelho controle (Abcam, EUA). Após três lavagens com PBS, o RNA coprecipitado com Ago2 ou IgG foi purificado e analisado por qRT-PCR.

Análise dos dados

As análises foram realizadas no GraphPad Prism versão 7.0.0 para Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts, EUA; www.graphpad.com. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP). Comparações entre dois grupos utilizaram teste *t* de Student bicaudal e não pareado; diferenças entre múltiplos grupos foram avaliadas por ANOVA de um fator com pós-teste de Bonferroni. As associações entre a expressão de ZEB1-AS1 e variáveis clínicas foram avaliadas com o teste do qui-quadrado. Normalidade e homocedasticidade foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente; $p > 0,05$ indicou que os pressupostos foram atendidos. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados

ZEB1-AS1 em pacientes com HVE e em HC induzida por ISO em células AC16

Quantificamos inicialmente ZEB1-AS1 em tecidos cardíacos de 20 pacientes com hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e de 10 corações de doadores normais por qRT-PCR. ZEB1-AS1 esteve significativamente superexpresso nos tecidos com HVE em comparação aos controles (Figura 1A).

Para modelar a HC in vitro, células AC16 foram tratadas com ISO (10 μ M). O ISO aumentou a área de superfície celular às 24 h, atingindo o máximo em 48 h em relação aos controles não tratados (Figura 1B). Em paralelo, o ISO promoveu aumentos dependentes do tempo nos níveis de mRNA e proteína de marcadores hipertróficos — BNP, ANP e β -MHC — quando comparados aos controles (Figuras 1C e 1D), confirmando o estabelecimento bem-sucedido do modelo de HC.

Notavelmente, a expressão de ZEB1-AS1 também aumentou de forma significativa nas células AC16 tratadas com ISO em relação aos controles (Figura 1E), sugerindo um papel de ZEB1-AS1 na progressão da HC.

A deficiência de ZEB1-AS1 atenua a HC induzida por ISO em células AC16

Para avaliar o papel de ZEB1-AS1 na hipertrofia induzida por ISO, células AC16 foram transfectadas com sh-ZEB1-AS1 ou sh-NC. A expressão de ZEB1-AS1 foi significativamente reduzida nas células sh-ZEB1-AS1 em comparação com sh-NC, confirmando *knockdown* eficiente (Figura 2A). O tratamento com ISO aumentou acentuadamente a área de superfície das AC16, consistente com alterações hipertróficas, ao passo que esse aumento foi significativamente atenuado nas células transfectadas com sh-ZEB1-AS1 (Figura 2B). De modo semelhante, o ISO superexpressou os níveis de mRNA

e proteína dos marcadores hipertróficos (BNP, ANP e β -MHC); essa indução foi substancialmente atenuada pelo *knockdown* de ZEB1-AS1 (Figuras 2C, D). Esses dados indicam que a redução de ZEB1-AS1 regula negativamente a HC induzida por ISO.

ZEB1-AS1 regula a expressão de HDAC2 por sequestro de miR-186-5p

Utilizamos starBase 2.0 para prever miRNAs que interagem com ZEB1-AS1 e identificamos o miR-186-5p como candidato (Figura 3A). Um ensaio repórter de dupla luciferase mostrou que a cotransfecção do *mimic* de miR-186-5p com o construto *wild type* de ZEB1-AS1 (ZEB1-AS1-WT) reduziu significativamente a atividade de luciferase em células AC16, ao passo que o construto mutante (ZEB1-AS1-MUT) não teve efeito (Figura 3B), confirmando ligação específica. Usando TargetScan, identificamos em seguida a HDAC2 como alvo a jusante putativo de miR-186-5p (Figura 3C). Essa interação foi validada por ensaio de luciferase: o *mimic* de miR-186-5p diminuiu a atividade do repórter HDAC2-WT, mas não do HDAC2-MUT (Figura 3D). O RIP demonstrou ainda enriquecimento de ZEB1-AS1, miR-186-5p e HDAC2 em imunoprecipitados com Ago2 a partir de lisados de AC16 (Figura 3E), indicando coassociação no complexo de silenciamento induzido por RNA.

Em tecidos miocárdicos de 20 pacientes com HVE versus 10 corações de doadores normais, a qRT-PCR revelou menor miR-186-5p e maior expressão de HDAC2 (Figuras 3F,G). Em conjunto, esses dados sustentam um eixo ZEB1-AS1/miR-186-5p/HDAC2 na HC, pelo qual ZEB1-AS1 modula HDAC2 ao “esponjar” miR-186-5p.

ZEB1-AS1 promove a HC regulando a via miR-186-5p/HDAC2

Para testar se ZEB1-AS1 impulsiona a HC via o eixo miR-186-5p/HDAC2, realizamos experimentos de *rescue*. O mRNA de HDAC2 foi medido em células AC16 estimuladas com ISO e transfectadas com sh-NC, sh-ZEB1-AS1 ou cotransfectadas com sh-ZEB1-AS1 mais um inibidor de miR-186-5p. O *knockdown* de ZEB1-AS1 reduziu significativamente o mRNA de HDAC2, e essa redução foi revertida pela inibição de miR-186-5p (Figura 4A). Do mesmo modo, o aumento induzido por ISO na área de superfície celular foi atenuado por sh-ZEB1-AS1, enquanto a inibição concomitante de miR-186-5p aboliu esse efeito (Figura 4B). Em paralelo, o *knockdown* de ZEB1-AS1 diminuiu a expressão de mRNA e proteína dos marcadores hipertróficos induzida por ISO (BNP, ANP e β -MHC), e esses efeitos supressores foram revertidos pela inibição de miR-186-5p (Figuras 4C e 4D). Coletivamente, os resultados indicam que ZEB1-AS1 promove a HC ao regular a via de sinalização miR-186-5p/HDAC2.

Discussão

Neste estudo, mostramos que ZEB1-AS1 está significativamente superexpresso na HC e que seu silenciamento atenua as respostas hipertróficas induzidas por ISO em células AC16. Mecanicamente, ensaios de

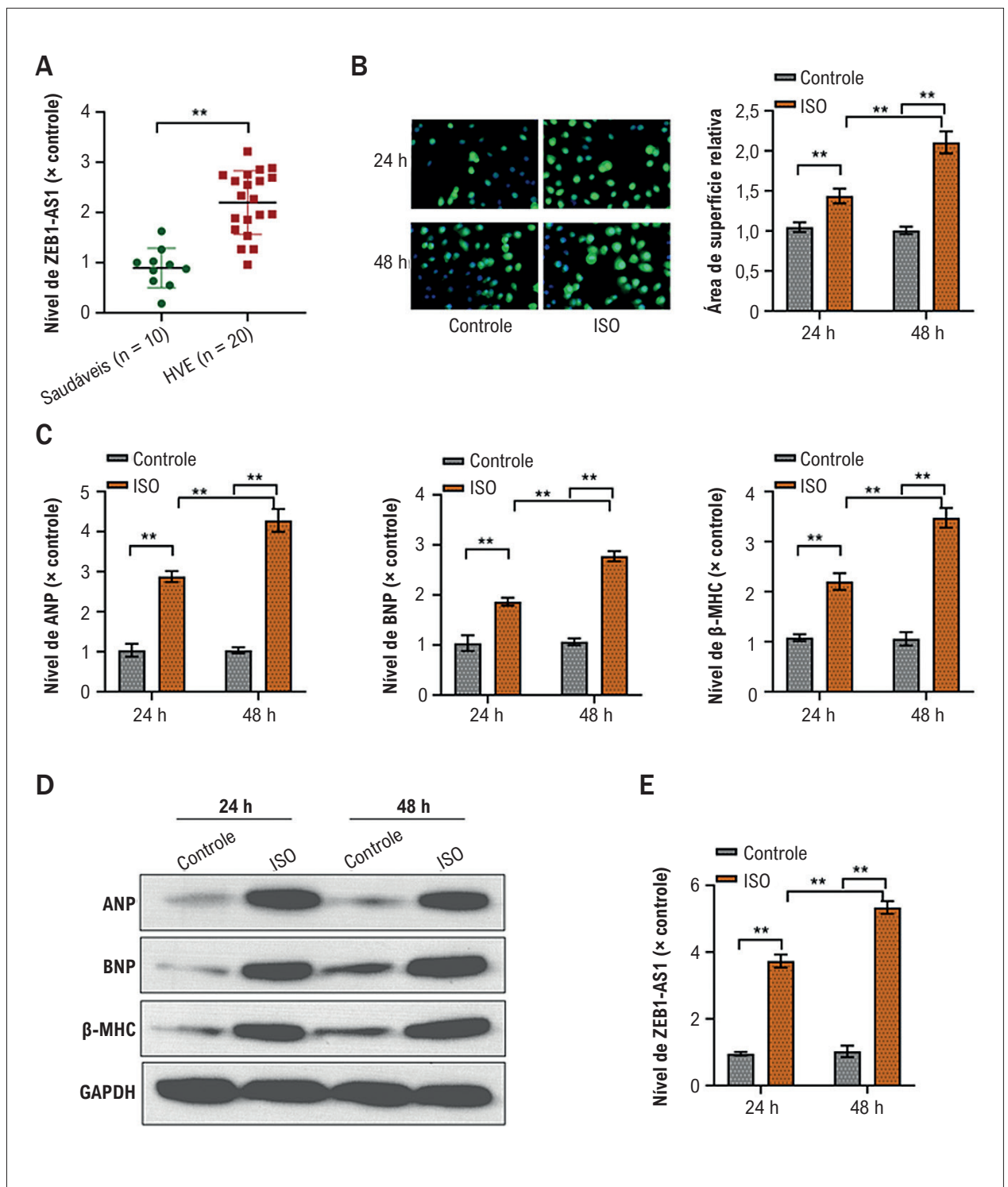


Figura 1 – Superexpressão de ZEB1-AS1 em tecidos com HVE e em células AC16 estimuladas com ISO. A) Expressão de ZEB1-AS1 em corações com HVE (n = 20) versus doadores normais (n = 10) por qRT-PCR; B) Área de superfície de células AC16 após tratamento com PBS ou ISO, avaliada por coloração por imunofluorescência; C) Níveis de mRNA de BNP, ANP e β -MHC em células AC16 após PBS ou ISO por qRT-PCR; D) Níveis de proteína de BNP, ANP e β -MHC em células AC16 após PBS ou ISO por Western blot; E) Expressão de ZEB1-AS1 em células AC16 após PBS ou ISO por qRT-PCR. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético tipo B; β -MHC: cadeia pesada de miosina β ; HC: hipertrofia cardíaca; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; ISO: isoproterenol; PBS: solução salina tamponada com fosfato; qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.

Artigo Original

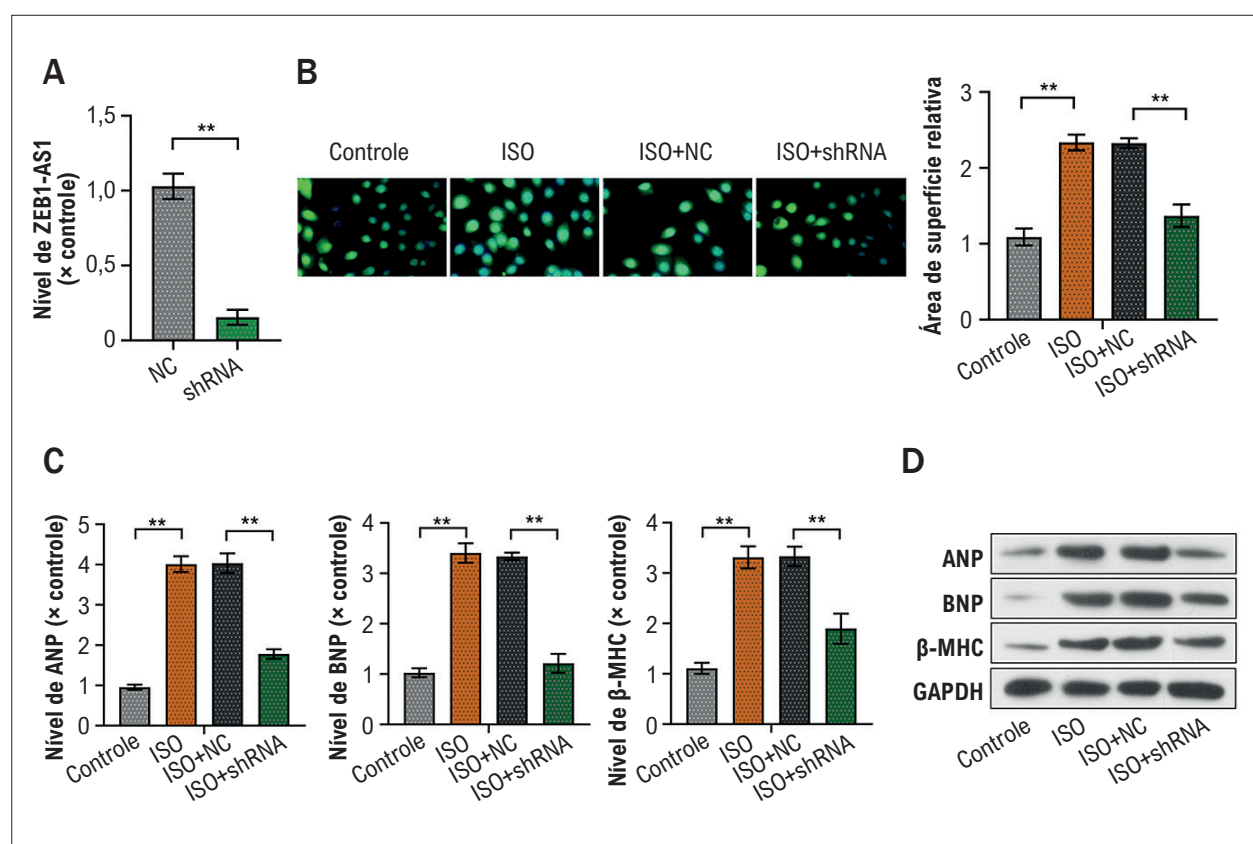


Figura 2 – A deficiência de ZEB1-AS1 atenua a HC induzida por ISO em células AC16. A) Expressão de ZEB1-AS1 em células AC16 transfectadas com sh-NC ou sh-ZEB1-AS1 por qRT-PCR; B) área de superfície das AC16 após estimulação com ISO com sh-NC ou sh-ZEB1-AS1, avaliada por coloração por imunofluorescência; C) níveis de mRNA de BNP, ANP e β-MHC em AC16 estimuladas com ISO com sh-NC ou sh-ZEB1-AS1 por qRT-PCR; D) níveis de proteína de BNP, ANP e β-MHC em AC16 estimuladas com ISO com sh-NC ou sh-ZEB1-AS1 por Western blot. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético tipo B; β-MHC: cadeia pesada de miosina β; HC: hipertrofia cardíaca; ISO: isoproterenol; qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; sh-NC: short hairpin RNA–negative control; sh-ZEB1-AS1: shRNA direcionado a ZEB1-AS1.

dupla luciferase e RIP confirmaram que miR-186-5p é alvo direto de ZEB1-AS1 e que HDAC2 é alvo de miR-186-5p, estabelecendo um eixo regulatório que contribui para a progressão da HC.

Os lncRNAs foram outrora considerados subprodutos transcricionais não funcionais,³⁷ mas evidências acumuladas indicam que regulam diversos processos biológicos por meio de interações com miRNAs, fatores de transcrição, DNA genômico e proteínas ligantes de RNA. Os lncRNAs têm sido cada vez mais reconhecidos no desenvolvimento cardíaco e na patogênese das doenças cardiovasculares. Por exemplo, o lncRNA MIR217HG exacerba a HC induzida por sobrecarga de pressão via a via miR-138/THBS1,³⁸ ADAMTS9-AS1/miR-185-5p/KAT7 atua como uma rede supressora de ceRNA na cardiomiopatia hipertrófica obstrutiva³⁹ e o knockdown de DANCER mitiga a IC ao atenuar HC e fibrose por meio do eixo miR-758-3p/PRG4/Smad.³⁵ ZEB1-AS1, inicialmente caracterizado em câncer, também tem sido implicado em diversas neoplasias,^{25,40,41} mas seu papel na HC permanecia incerto.

Aqui, identificamos ZEB1-AS1 como um lncRNA pró-hipertrofico: ele se encontra aumentado em tecidos com HVE e em células AC16 tratadas com ISO, e seu knockdown reduz a hipertrofia induzida por ISO, indicando um papel patogênico no desenvolvimento e na progressão da HC.

Os lncRNAs frequentemente atuam em redes de ceRNA para regular a expressão gênica no pós-transcricional, sequestrando miRNAs e, assim, modulando sua disponibilidade para mRNAs-alvo.^{42,43} A importância dos circuitos de ceRNA na HC foi corroborada por diversos estudos.⁴⁴⁻⁴⁶ De modo consistente, mostramos que ZEB1-AS1 funciona como sponge para miR-186-5p — um miRNA relatado como reduzido no tecido cardíaco em cardiomiopatia diabética⁴⁷ — aliviando a repressão de HDAC2 e promovendo a hipertrofia induzida por ISO. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato que implica miR-186-5p na HC, ressaltando seu potencial como ponto de entrada terapêutico.

As HDACs são contribuintes-chave para a patologia cardiovascular.^{30-32,48-50} Trabalhos prévios mostraram que a inibição de HDAC atenua a HC induzida por sobrecarga

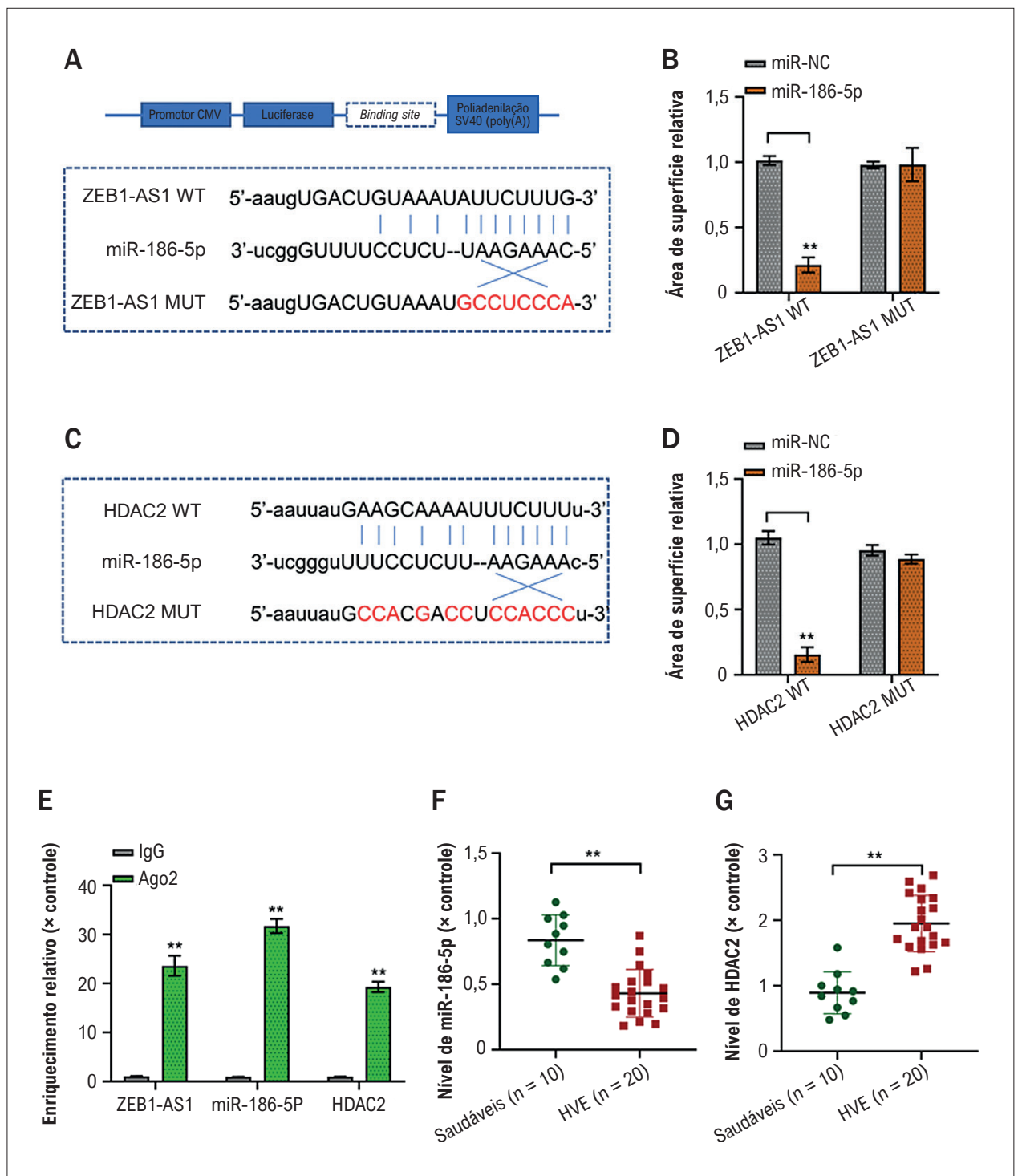


Figura 3 – ZEB1-AS1 regula HDAC2 ao sequestrar miR-186-5p. A) Sítio previsto de ligação de miR-186-5p em ZEB1-AS1 (WT) e construto mutante (MUT) correspondente. B) Ensaio de dupla luciferase mostrando redução da atividade do repórter para ZEB1-AS1-WT, mas não para ZEB1-AS1-MUT, na presença do mimic de miR-186-5p. C) Sítio previsto de ligação de miR-186-5p na 3'-RNT de HDAC2 (WT) e construto MUT. D) Ensaio de dupla luciferase mostrando diminuição da atividade para HDAC2-WT, mas não para HDAC2-MUT, com mimic de miR-186-5p. E) RIP demonstrando enriquecimento de ZEB1-AS1, miR-186-5p e HDAC2 em imunoprecipitados com Ago2. F-G) Níveis de miR-186-5p e de HDAC2 em corações com HVE (n = 20) versus doadores normais (n = 10) por qRT-PCR. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *p < 0,05, **p < 0,01. Ago2: Argonata-2; CMV: citomegalovírus; HDAC2: desacetilase de histonas 2; LVH: hipertrofia ventricular esquerda; miR-NC: mimic de controle negativo; MUT: mutante; qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; RIP: imunoprecipitação de RNA; RNT: região não traduzida; WT: wild type.

Artigo Original

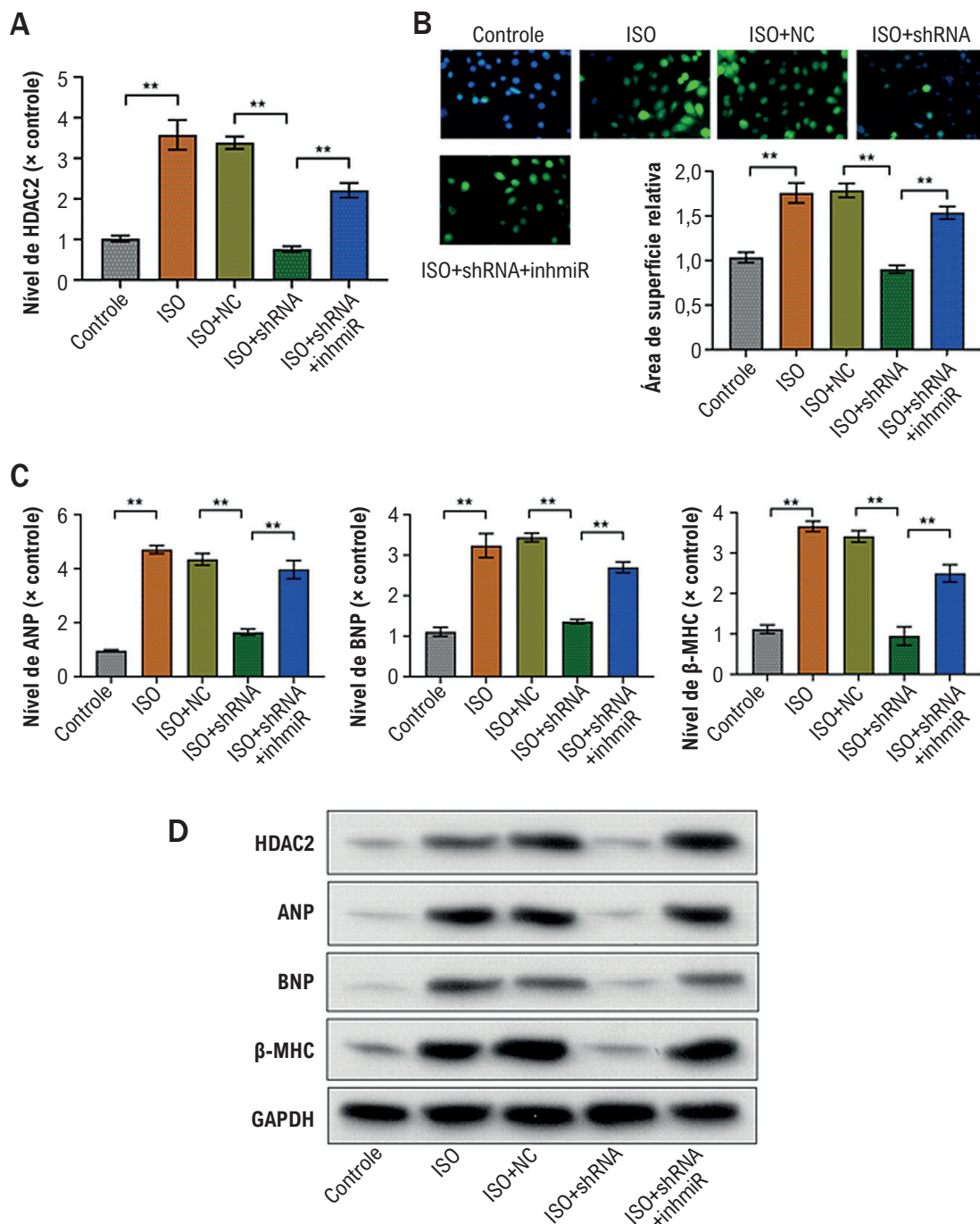


Figura 4 – ZEB1-AS1 promove a HC ao regular a via miR-186-5p/HDAC2. A) mRNA de HDAC2 em células AC16 estimuladas com ISO e transfectadas com os construtos indicados, medido por qRT-PCR; B) área de superfície das AC16 após estimulação com ISO e transfecção com os construtos indicados, avaliada por coloração por imunofluorescência; C) níveis de mRNA de BNP, ANP e β-MHC em AC16 estimuladas com ISO após transfecção, medidos por qRT-PCR; D) níveis de proteína de BNP, ANP e β-MHC em AC16 estimuladas com ISO após transfecção, medidos por Western blot. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético tipo B; β-MHC: cadeia pesada de miosina β; HC: hipertrofia cardíaca; HDAC2: histone deacetylase 2; ISO: isoproterenol; qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; sh-NC: short hairpin RNA–negative control; sh-ZEB1-AS1: zinc finger E-box binding homeobox 1 antisense RNA 1 direcionado ao short hairpin RNA.

de pressão ou por infusão de ISO,^{51,52} em linha com nosso modelo in vitro baseado em ISO. Entre as HDACs, a HDAC2 tem recebido atenção particular; a fosforilação na serina 394 é um evento regulatório crítico na progressão da HC.⁵³ Por exemplo, o efeito anti-hipertrofico de plantamajoside na HC induzida por ISO associa-se estreitamente à HDAC2,³² e EYA4-au1 promove hipertrofia de cardiomiócitos ao recrutar Med11 para superexpressar EYA4, levando à redução de p27^{Kip1} e à ativação do eixo CK2 α /HDAC2.⁵⁴ Apesar do papel estabelecido da HDAC2, sua regulação a montante via redes lncRNA-miRNA-mRNA tem sido menos clara. Nossos dados indicam que HDAC2 é alvo direto de miR-186-5p e que ZEB1-AS1 promove HC modulando o eixo miR-186-5p/HDAC2.

Limitações do estudo

Este estudo apresenta algumas limitações. Como lncRNAs frequentemente interagem com múltiplos miRNAs e miRNAs individuais tipicamente regulam numerosos alvos, ZEB1-AS1 pode influenciar vias adicionais relevantes para a HC que não foram examinadas aqui. Esses mecanismos alternativos merecem investigação futura. Além disso, embora o intervalo pós-morte para tecidos de autópsia tenha sido breve, a degradação de RNA permanece uma potencial fonte de viés e pode afetar análises transcriptômicas. Avaliação rigorosa da integridade do RNA é, portanto, essencial para assegurar validade e reprodutibilidade, e será foco de trabalhos futuros.

Conclusão

ZEB1-AS1 está marcadamente superexpresso em tecidos com HVE e em células AC16 estimuladas com ISO. Funcionalmente, ZEB1-AS1 promove a HC atuando como ceRNA para miR-186-5p a fim de modular a expressão de HDAC2. Esses achados definem um eixo ZEB1-AS1/miR-186-5p/HDAC2 na patogênese da HC e fornecem base mecanística para explorar estratégias terapêuticas direcionadas.

Referências

1. Martin TG, Juarros MA, Leinwand LA. Regression of Cardiac Hypertrophy in Health and Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(5):347-63. doi: 10.1038/s41569-022-00806-6.
2. Ritterhoff J, Tian R. Metabolic Mechanisms in Physiological and Pathological Cardiac Hypertrophy: New Paradigms and Challenges. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(12):812-29. doi: 10.1038/s41569-023-00887-x.
3. Pohjolainen L, Kinnunen SM, Auno S, Kiriazis A, Pohjavaara S, Kari-Koskinen J, et al. Switching of Hypertrophic Signalling Towards Enhanced Cardiomyocyte Identity and Maturity by a GATA4-Targeted Compound. *Stem Cell Res Ther.* 2024;15(1):5. doi: 10.1186/s13287-023-03623-x.
4. Li D, Guo YY, Cen XF, Qiu HL, Chen S, Zeng XF, et al. Lupeol Protects Against Cardiac Hypertrophy Via TLR4-PI3K-Akt-NF- κ B Pathways. *Acta Pharmacol Sin.* 2022;43(8):1989-2002. doi: 10.1038/s41401-021-00820-3.
5. Ba L, Gao J, Chen Y, Qi H, Dong C, Pan H, et al. Allicin Attenuates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting Autophagy Via Activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR Signaling Pathways. *Phytomedicine.* 2019;58:152765. doi: 10.1016/j.phymed.2018.11.025.
6. Vinet L, Pezet M, Bito V, Briec F, Biesmans L, Rouet-Benzineb P, et al. Cardiac FKBP12.6 Overexpression Protects Against Triggered Ventricular Tachycardia in Pressure Overloaded Mouse Hearts. *Basic Res Cardiol.* 2012;107(2):246. doi: 10.1007/s00395-012-0246-8.
7. Wen J, Liu G, Liu M, Wang H, Wan Y, Yao Z, et al. Transforming Growth Factor- β and Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathways in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Cell Cycle.* 2023;22(21):2467-84. doi: 10.1080/15384101.2023.2293595.
8. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137(12):e67-e492. doi: 10.1161/CIR.0000000000000558.
9. Esteller M. Non-Coding RNAs in Human Disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):861-74. doi: 10.1038/nrg3074.
10. Chong X, Chen J, Zheng N, Zhou Z, Hai Y, Chen S, et al. PIK3CA Mutations-Mediated Downregulation of circLHFPL2 Inhibits Colorectal Cancer Progression Via Upregulating PTEN. *Mol Cancer.* 2022;21(1):118. doi: 10.1186/s12943-022-01531-x.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Cao B, Wang Y; Obtenção de dados: Cao B; Análise e interpretação dos dados: Liu Q; Análise estatística: Zhang X; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo: Wang Y.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Weihai Central Hospital sob o número de protocolo WKY-2023-008. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Uso de Inteligência Artificial

Os autores não utilizaram ferramentas de inteligência artificial no desenvolvimento deste trabalho.

Disponibilidade de Dados

Todo o conjunto de dados que dá suporte aos resultados deste estudo está disponível mediante solicitação ao autor correspondente Bingfeng Cao.

11. Liu Z, Zheng N, Li J, Li C, Zheng D, Jiang X, et al. N6-Methyladenosine-Modified Circular RNA QSOX1 Promotes Colorectal Cancer Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy Through Induction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Drug Resist Updat.* 2022;65:100886. doi: 10.1016/j.drug.2022.100886.
12. Zhan Y, Liu Y, Yang R, Chen Q, Teng F, Huang Y, et al. CircPTEN Suppresses Human Clear Cell Renal Carcinoma Progression and Resistance to mTOR Inhibitors by Targeting Epigenetic Modification. *Drug Resist Updat.* 2023;71:101003. doi: 10.1016/j.drug.2023.101003.
13. Cheng S, Li C, Liu L, Liu X, Li M, Zhuo J, et al. Dysregulation and Antimetastatic Function of circLRIG1 Modulated by miR-214-3p/LRIG1 Axis in Bladder Carcinoma. *Biol Direct.* 2024;19(1):20. doi: 10.1186/s13062-023-00446-x.
14. Tsagakis I, Douka K, Birds I, Aspden JL. Long Non-Coding RNAs in Development and Disease: Conservation to Mechanisms. *J Pathol.* 2020;250(5):480-95. doi: 10.1002/path.5405.
15. Han S, Chen X, Huang L. The Tumor Therapeutic Potential of Long Non-Coding RNA Delivery and Targeting. *Acta Pharm Sin B.* 2023;13(4):1371-82. doi: 10.1016/j.apsb.2022.12.005.
16. Fang X, Song J, Chen Y, Zhu S, Tu W, Ke B, et al. LncRNA SNHG1 Knockdown Inhibits Hyperglycemia Induced Ferroptosis Via miR-16-5p/ACSL4 Axis to Alleviate Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Investig.* 2023;14(9):1056-69. doi: 10.1111/jdi.14036.
17. Tai YY, Yu Q, Tang Y, Sun W, Kelly NJ, Okawa S, et al. Allele-Specific Control of Rodent and Human lncRNA KMT2E-AS1 Promotes Hypoxic Endothelial Pathology in Pulmonary Hypertension. *Sci Transl Med.* 2024;16(729):eadd2029. doi: 10.1126/scitranslmed.add2029.
18. Kong X, Duan Y, Sang Y, Li Y, Zhang H, Liang Y, et al. LncRNA-CDC6 Promotes Breast Cancer Progression and Function as ceRNA to Target CDC6 by Sponging microRNA-215. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):9105-17. doi: 10.1002/jcp.27587.
19. Jiang X, Zhang M. The Roles of Long Noncoding RNA NEAT1 in Cardiovascular Diseases. *Hypertens Res.* 2024;47(3):735-46. doi: 10.1038/s41440-023-01551-0.
20. Li S, He RC, Wu SC, Song Y, Zhang KL, Tang ML, et al. LncRNA PSMB8-AS1 Instigates Vascular Inflammation to Aggravate Atherosclerosis. *Circ Res.* 2024;134(1):60-80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.322360.
21. Tan T, Tu L, Yu Y, He M, Zhou X, Yang L. Mechanisms by Which Silencing Long-Stranded Noncoding RNA KCNQ1OT1 Alleviates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury (MI/RI)-Induced Cardiac Injury Via miR-377-3p/HMOX1. *BMC Cardiovasc Disord.* 2024;24(1):19. doi: 10.1186/s12872-023-03693-y.
22. Zhang G, Ni X. Knockdown of TUG1 Rescues Cardiomyocyte Hypertrophy Through Targeting the miR-497/MEF2C Axis. *Open Life Sci.* 2021;16(1):242-51. doi: 10.1515/biol-2021-0025.
23. Wu Q, Chen Q, Wang J, Fan D, Zhou H, Yuan Y, et al. Long Non-Coding RNA Pvt1 Modulates the Pathological Cardiac Hypertrophy Via miR-196b-Mediated OSMR Regulation. *Cell Signal.* 2021;86:110077. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110077.
24. Sun XL, Lv JL, Dou L, Chen D, Zhu YC, Hu X. LncRNA NEAT1 Promotes Cardiac Hypertrophy Through microRNA-19a-3p/SMYD2 Axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(3):1367-77. doi: 10.26355/eurrev_202002_20194.
25. Lu Q, Chen W, Ji Y, Liu Y, Xue X. Ursolic Acid Enhances Cytotoxicity of Doxorubicin-Resistant Triple-Negative Breast Cancer Cells Via ZEB1-AS1/miR-186-5p/ABCC1 Axis. *Cancer Biother Radiopharm.* 2022;37(8):673-83. doi: 10.1089/cbr.2020.4147.
26. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. Argonaute HITS-CLIP Decodes microRNA-mRNA Interaction Maps. *Nature.* 2009;460(7254):479-86. doi: 10.1038/nature08170.
27. Samadishadlou M, Rahbarghazi R, Piryaee Z, Esmaeili M, Avcı CB, Bani F, et al. Unlocking the Potential of microRNAs: Machine Learning Identifies Key Biomarkers for Myocardial Infarction Diagnosis. *Cardiovasc Diabetol.* 2023;22(1):247. doi: 10.1186/s12933-023-01957-7.
28. Ren L, Chen S, Yao D, Yan H. OxLDL-Stimulated Macrophage Exosomes Promote Proatherogenic Vascular Smooth Muscle Cell Viability and Invasion Via Delivering miR-186-5p then Inactivating SHIP2 Mediated PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Mol Immunol.* 2022;146:27-37. doi: 10.1016/j.molimm.2022.02.018.
29. Ye Q, Ju C, Ye Z, Tong J. Circ_ROBO2/miR-186-5p/TRIM14 Axis Regulates Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Cardiac Microvascular Endothelial Cell Injury. *Regen Ther.* 2022;20:138-46. doi: 10.1016/j.reth.2022.04.005.
30. Zhao T, Kee HJ, Bai L, Kim MK, Kee SJ, Jeong MH. Selective HDAC8 Inhibition Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy and Fibrosis via p38 MAPK Pathway. *Front Pharmacol.* 2021;12:677757. doi: 10.3389/fphar.2021.677757.
31. Yoon S, Kim M, Min HK, Lee YU, Kwon DH, Lee M, et al. Inhibition of Heat Shock Protein 70 Blocks the Development of Cardiac Hypertrophy by Modulating the Phosphorylation of Histone Deacetylase 2. *Cardiovasc Res.* 2019;115(13):1850-60. doi: 10.1093/cvr/cvy317.
32. Shang L, Pin L, Zhu S, Zhong X, Zhang Y, Shun M, et al. Plantamajoside Attenuates Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy Associated with the HDAC2 and AKT/ GSK-3 β Signaling Pathway. *Chem Biol Interact.* 2019;307:21-8. doi: 10.1016/j.cbi.2019.04.024.
33. Zhu C, Wang M, Yu X, Shui X, Tang L, Chen Z, et al. lncRNA NBR2 Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Hypertrophy Through Repressing ER Stress Via Activating LKB1/AMPK/Sirt1 Pathway. *Bioengineered.* 2022;13(5):13667-79. doi: 10.1080/21655979.2022.2062527.
34. Issue Information-Declaration of Helsinki. *J Bone Miner Res.* 2019;34(3):BMi-BMii. doi: 10.1002/jbmr.3492.
35. Huang Q, Huang Q. Inhibition of lncRNA DANCER Prevents Heart Failure by Ameliorating Cardiac Hypertrophy and Fibrosis Via Regulation of the miR-758-3p/PRG4/Smad Axis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2023;16(6):1357-72. doi: 10.1007/s12265-023-10428-z.
36. Isse FA, Alammari AH, El-Sherbeni AA, El-Kadi AOS. 17-(R/S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (HETE) Induces Cardiac Hypertrophy Through the CYP1B1 in Enantioselective Manners. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2023;168:106749. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2023.106749.
37. Comings DE. The Structure and Function of Chromatin. *Adv Hum Genet.* 1972;3:237-431. doi: 10.1007/978-1-4757-4429-3_5.
38. Nie X, Xie R, Fan J, Wang DW. LncRNA MIR217HG Aggravates Pressure-Overload Induced Cardiac Remodeling by Activating miR-138/THBS1 Pathway. *Life Sci.* 2024;336:122290. doi: 10.1016/j.lfs.2023.122290.
39. Song B, Li W, Xu X, Dang H, Dong R. The lncRNA ADAMTS9-AS1/miR-185-5p/KAT7 ceRNA Network Inhibits Cardiomyocyte Hypertrophy in Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy. *Biomed Res.* 2023;44(3):105-15. doi: 10.2220/biomedres.44.105.
40. Xue S, Lu F, Sun C, Zhao J, Zhen H, Li X. LncRNA ZEB1-AS1 Regulates Hepatocellular Carcinoma Progression by Targeting miR-23c. *World J Surg Oncol.* 2021;19(1):121. doi: 10.1186/s12957-021-02176-8.
41. Wu C, Hou X, Li S, Luo S. Long Noncoding RNA ZEB1-AS1 Attenuates Ferroptosis of Gastric Cancer Cells Through Modulating miR-429/BGN Axis. *J Biochem Mol Toxicol.* 2023;37(8):e23381. doi: 10.1002/jbt.23381.
42. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017;169(6):985-99. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.
43. Chen X, Zhou S, Chen Y, Tong K, Huang W. LncRNA MIR22HG/microRNA-9-3p/IGF1 in Nonalcoholic Steatohepatitis, the ceRNA Network Increases Fibrosis by Inhibiting Autophagy and Promoting Pyroptosis. *Clin Nutr.* 2024;43(1):52-64. doi: 10.1016/j.clnu.2023.11.004.
44. Jiao W, Hao J, Liu JM, Gao WN, Zhao JJ, Li YJ. Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicle-Incorporated H19 Attenuates Cardiac Remodeling in Rats with Heart Failure. *Kaohsiung J Med Sci.* 2024;40(1):46-62. doi: 10.1002/kjm2.12774.

45. Liu P, Dong X, Dong C, Hou G, Liu W, Jiang X, et al. LncRNA MHRT Prevents Angiotensin II-Induced Myocardial Oxidative Stress and NLRP3 Inflammasome Via Nrf2 Activation. *Antioxidants*. 2023;12(3):672. doi: 10.3390/antiox12030672.
46. Zhu W, Peng F, Cui X, Li J, Sun C. LncRNA SOX2OT Facilitates LPS-Induced Inflammatory Injury by Regulating Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) Via Sponging miR-215-5p. *Clin Immunol*. 2022;238:109006. doi: 10.1016/j.clim.2022.109006.
47. Liu Y, Zheng W, Pan Y, Hu J. Low Expression of miR-186-5p Regulates Cell Apoptosis by Targeting Toll-Like Receptor 3 in High Glucose-Induced Cardiomyocytes. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):9532-8. doi: 10.1002/jcb.28229.
48. Wang L, Ahn YJ, Asmis R. Inhibition of Myeloid HDAC2 Upregulates Glutaredoxin 1 Expression, Improves Protein Thiol Redox State and Protects Against High-Calorie Diet-Induced Monocyte Dysfunction and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2021;328:23-32. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.002.
49. Yang P, Liang K, Wang W, Zhou D, Chen Y, Jiang X, et al. LncRNA SOX2-OT inhibition protects Against Myocardial ischemia/Reperfusion-Induced injury Via the microRNA-186-5p (miR-186-5p)/Yin Yang 1 (YY1) Pathway. *Bioengineered*. 2022;13(1):280-90. doi: 10.1080/21655979.2021.2000229.
50. Feng Y, Yan B, Cheng H, Wu J, Chen Q, Duan Y, et al. Knockdown circ_0040414 Inhibits Inflammation, Apoptosis and Promotes the Proliferation of Cardiomyocytes Via miR-186-5p/PTEN/AKT Axis in Chronic Heart Failure. *Cell Biol Int*. 2021;45(11):2304-15. doi: 10.1002/cbin.11678.
51. Cheng T, Liu C, Wang Y, Li G, Feng L, Zhang S, et al. A Novel Histone Deacetylase Inhibitor Se-SAHA Attenuates Isoproterenol-Induced Heart Failure Via Antioxidative Stress and Autophagy Inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2024;487:116957. doi: 10.1016/j.taap.2024.116957.
52. Zhou H, Kee HJ, Wan L, Asfaha Y, Fischer F, Kassack MU, et al. YAK577 Attenuates Cardiac Remodeling and Fibrosis in Isoproterenol-Infused Heart Failure Mice by Downregulating MMP12. *Korean Circ J*. 2025;55(3):231-47. doi: 10.4070/kcj.2024.0093.
53. Raghunathan S, Goyal RK, Patel BM. Selective Inhibition of HDAC2 by Magnesium Valproate Attenuates Cardiac Hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(3):260-7. doi: 10.1139/cjpp-2016-0542.
54. Zhao J, Gong F, Yang Q, Yang R, Yan Z, Xi Z, et al. Exercise in Ozone-Polluted Air Evokes Pathological Cardiac Hypertrophy Via Up-Regulation of Nuclear IncRNA EYA4-au1 and Recruiting Med11 to Activating EYA4/p27kip1/CK2 α /HDAC2 Cascade. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2024;287:117264. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.117264.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons