

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

Alexandra Pérez Serra

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE NUEVOS BIOMARCADORES
PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
MIOCARDIOPATÍA DILATADA**

Alexandra Pérez Serra

2024



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización de nuevos
biomarcadores para el diagnóstico de la
miocardiopatía dilatada.**

Alexandra Pérez Serra

2024

Programa de Doctorado en Biología Molecular, Biomedicina y Salud.

Dirigida por: Rocío Toro Cebada, Oscar Campuzano Larrea,

Ramon Brugada Terradellas

Tutor: Oscar Campuzano Larrea

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universitat de Girona.

Per als meus fills, Biel i Àlex.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento por el tiempo, la confianza y la dedicación que ha demostrado la dra. Rocío Toro para la elaboración de este trabajo doctoral. Sin su insistencia y profesionalidad no habría sido posible lograrlo.

También debo agradecer al dr. Oscar Campuzano su paciencia, comprensión y entrega para lograr los objetivos propuestos. Siempre ha estado dispuesto a atenderme y tranquilizar todas las dudas.

Por último, estoy muy agradecida a la fe ciega que el dr. Ramon Brugada puso en mí hace quince años cuando decidió darme un lugar de trabajo en su grupo de investigación. Mi madurez profesional y personal han ido siempre muy unidas a un laboratorio que en todo momento sentí mío y al que hemos hecho crecer constantemente.

1 ARTÍCULOS ORIGINALES INCLUIDOS EN LA TESIS

Esta tesis es un compendio de tres artículos de investigación publicados entre enero y julio de 2022 y un tercero aceptado para publicación en marzo de 2024.

Rocío Toro, **Alexandra Pérez-Serra**, Alipio Mangas, Oscar Campuzano, Georgia Sarquella-Brugada, Maribel Quezada-Feijoo, Mónica Ramos, Martin Alcalá, Esther Carrera, Carlos García-Padilla, Diego Franco, Fernando Bonet. *miR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury*. Int J Mol Sci. 2022;23(3):1036. Published 2022 Jan 18. doi:10.3390/ijms23031036. Co-primera autora
IF:5,6 Tercil:1 Cuartil:1 BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (JCR_2022)

Alipio Mangas, **Alexandra Pérez-Serra**, Fernando Bonet, Ovidio Muñiz, Francisco Fuentes, Aurora Gonzalez-Estrada, Oscar Campuzano, Juan Sebastian Rodriguez Roca, Elena Alonso-Villa, Rocio Toro. *A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance*. Int J Mol Sci. 2022;23(15):8146. Published 2022 Jul 24. doi:10.3390/ijms23158146. Co-primera autora
IF:5,6 Tercil:1 Cuartil:1 BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (JCR_2022)

Alexandra Pérez-Serra, Rocío Toro, Estefanía Martinez-Barrios, Anna Iglesias, Anna Fernandez-Falgueras, Mireia Alcalde, Mónica Coll, Marta Puigmulé, Bernat del Olmo, Ferran Picó, Laura Lopez, Elena Arbelo, Sergi Cesar, Coloma Tiron de Llano, Alipio Mangas, Josep Brugada, Georgia Sarquella-Brugada, Ramon Brugada, Oscar Campuzano. *Implementing a New Algorithm for Reinterpretation of Ambiguous Variants in Genetic Dilated Cardiomyopathy*. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 3807. doi.org/10.3390/ijms25073807 Co-primera autora
IF:5,6 Tercil: 1 Cuartil: 1 BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (JCR_2022)

2 PARTICIPACIÓN EN OTRAS PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS (2022-2024)

Pairo-Castineira E, Rawlik K, Bretherick AD, et al. GWAS and meta-analysis identifies 49 genetic variants underlying critical COVID-19 [published correction appears in *Nature*. 2023 Jul;619(7971):E61]. *Nature*. 2023;617(7962):764-768. doi:10.1038/s41586-023-06034-3

Martínez-Moreno R, Pérez-Serra A, Selga E, et al. Generation of the induced pluripotent stem cell line ESi108-A from a familial atrial fibrillation patient. *Stem Cell Res*. 2023;73:103239. doi:10.1016/j.scr.2023.103239

Martinez-Barrios E, Sarquella-Brugada G, Perez-Serra A, et al. Reevaluation of ambiguous genetic variants in sudden unexplained deaths of a young cohort. *Int J Legal Med*. 2023;137(2):345-351. doi:10.1007/s00414-023-02951-0

Cesar S, Coll M, Fiol V, et al. LMNA-related muscular dystrophy: Identification of variants in alternative genes and personalized clinical translation. *Front Genet*. 2023;14:1135438. Published 2023 Mar 24. doi:10.3389/fgene.2023.1135438

Oliva A, Grassi S, Pinchi V, et al. Structural Heart Alterations in Brugada Syndrome: Is it Really a Channelopathy? A Systematic Review. *J Clin Med*. 2022;11(15):4406. Published 2022 Jul 28. doi:10.3390/jcm11154406

Coll M, Fernàndez-Falgueras A, Tiron C, et al. Post-mortem toxicology analysis in a young sudden cardiac death cohort. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;59:102723. doi:10.1016/j.fsigen.2022.102723

Puigmulé M, Coll M, Pérez-Serra A, et al. High-quality RNA improves sensitivity of SARS-CoV-2 detection by colorimetric RT-LAMP. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(3):276-281. doi:10.1177/15353702211054768

Martínez-Barrios E, Sarquella-Brugada G, Pérez-Serra A, et al. Discerning the Ambiguous Role of Missense *TTN* Variants in Inherited Arrhythmogenic Syndromes. *J Pers Med*. 2022;12(2):241. Published 2022 Feb 8. doi:10.3390/jpm12020241

Coll M, Fernandez-Falgueras A, Iglesias A, et al. Unpredicted Aberrant Splicing Products Identified in Postmortem Sudden Cardiac Death Samples. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12640. Published 2022 Oct 20. doi:10.3390/ijms232012640

Alcalde M, Nogué-Navarro L, Tiron C, et al. Rare variants in genes encoding structural myocyte contribute to a thickened ventricular septum in sudden death population without ventricular alterations. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;58:102688. doi:10.1016/j.fsigen.2022.102688

Sarquella-Brugada G, Fernandez-Falgueras A, Cesar S, et al. Clinical impact of rare variants associated with inherited channelopathies: a 5-year update. *Hum Genet*. 2022;141(10):1579-1589. doi:10.1007/s00439-021-02370-4

3 LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG.	<i>American College of Medical Genetics.</i>
ADN.	Ácido desoxiribonucleico.
ATF4.	Activador del factor de transcripción 4.
ATF6.	Activador del factor de transcripción 6.
B.	Benigna.
CAD.	Enfermedad de las arterias coronarias.
CHOP.	Proteína homóloga del factor de transcripción C / EBP.
DCM.	Miocardiopatía dilatada.
DNA.	Ácido desoxiribonucleico.
DROSHA2.	Proteína Drosha homóloga.
ECG.	Electrocardiograma.
ECVs	Enfermedades cardiovasculares.
ETT.	Ecocardiografía transtorácica.
FE.	Fracción de eyección.
FEVI.	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.
Gal-3.	Galectina-3.
GRP78.	<i>Glucose-regulated proteins 78.</i>
GRPs	<i>Glucose-regulated proteins.</i>
HDLc.	Colesterol HDL.
HMG-CoAR.	3-hidroxi-3-metilglutaril Co-A reductasa.
IC.	Insuficiencia cardíaca.
IE.	Intolerante a estatinas.
IRE1.	Enzima requeridora de inositol.
iRNA.	RNA de interferencia.
LB.	Probablemente benigna.
LDLc.	Lipoproteína de baja densidad colesterol.
LDL-R.	Receptor de LDL.
Inc RNA.	RNA no codificante largo.
Lp (a).	Lipoproteína a.
LP.	Probablemente patogénica.
MC.	Miocardiopatía.
MCD.	Miocardiopatía dilatada.
miRNA.	microRNA.
mRNA.	RNA mensajero.
MSC.	Muerte súbita cardíaca.
ncDNA.	ADN no codificante.
ncRNA.	RNA no codificante.
NGS.	Secuenciación de nueva generación.
NT proBNP.	Péptido natriurético de tipo N-terminal pro-B.
NYHA.	<i>New York Heart Association.</i>
P.	Patogénica.
PCR.	Proteína C reactiva.
PCSK-9.	Proteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9.
PERK.	Quinasa dependiente de RNA de doble cadena inducida por interferón
piRNA.	<i>Piwi-interacting.</i>

Pri-miRNA.	Transcrito primario de miRNA.
RE.	Retículo endoplasmático.
RISC.	Complejo de silenciamiento inducido por RNA.
RMC.	Resonancia magnética cardíaca.
RNA.	Acido ribonucleico.
ROS.	Especies reactivas de oxígeno.
rRNA.	RNA ribosómico.
SAMS.	Efectos musculares adversos derivados del tratamiento con estatinas.
siRNA.	RNA de interferencia.
snoRNA.	RNA pequeños nucleolares.
snRNA.	RNA pequeños nucleares.
tiRNA.	tRNA derivados de miRNA.
TNC.	Troponina C.
TNF- α .	Factor de necrosis tumoral- α .
TnI.	Troponina I.
TnT.	Troponina T.
TRAIL.	Ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF.
tRNA.	RNA de transferencia.
UPR.	Respuesta de proteínas mal plegadas.
VD.	Ventrículo derecho.
VI.	Ventrículo izquierdo.
VUS.	Variante de significado incierto.

4 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anomalías estructurales del miocardio asociadas a las diferentes miocardiopatías (página 23).

Figura 2. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de activación de la apoptosis (página 28).

Figura 3. Rutas de activación en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas y desplegadas en el retículo endoplásmico (página 32).

Figura 4. Esquema del proceso autofágico y su regulación (página 33).

Figura 5. Principales genes asociados a la MCD y sus funciones celulares (página 41).

Figura 6. Esquema de la biogénesis de los miRNAs (página 54).

Figura 7. Rutas de biogénesis de los miRNAs alternativas a la canónica (página 55).

Figura 8: Familias de miRNAs (página 56).

Figura 9. Análisis KEGG y GO de miRNAs expresados diferencialmente (página 68).

5 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la insuficiencia cardíaca de la *New York Heart Association* (página 25).

Tabla 2. Principales genes asociados a la miocardiopatía dilatada (página 38).

Tabla 3. Evaluación del valor diagnóstico potencial de los miRNAs expresados diferencialmente y el panel de 5 miRNAs (página 68).

6 TABLA DE CONTENIDO

1	ARTÍCULOS ORIGINALES INCLUIDOS EN LA TESIS	5
2	PARTICIPACIÓN EN OTRAS PUBLICACIONES DURANTE LA TESIS (2022-2024)	6
3	LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
4	ÍNDICE DE FIGURAS	100
5	ÍNDICE DE TABLAS	111
6	TABLA DE CONTENIDO	122
7	RESUM.....	154
8	RESUMEN	155
9	ABSTRACT	166
10	INTRODUCCIÓN	177
11	ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	188
11.1	FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	200
11.2	COLESTEROL Y ESTATINAS.....	211
11.3	SÍNTOMAS MUSCULARES ASOCIADOS A LAS ESTATINAS	244
12	FISIOLOGÍA DE LAS MIOCARDIOPATÍAS	266
12.1	MIOCARDIOPATÍA DILATADA	277
12.2	FISIOPATOLOGÍA CELULAR EN MCD.....	311
12.2.1	APOPTOSIS.....	311
12.2.2	ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO	333
12.2.3	AUTOFAGIA	366
12.2.4	ESTRÉS OXIDATIVO	377
12.2.5	RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, APOPTOSIS, AUTOFAGIA Y ROS.	388
13	BIOMARCADORES EN CARDIOLOGÍA	411
13.1	BASES GENÉTICAS DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA.....	422
13.1.1	PROTEÍNAS DEL SARCÓMERO CELULAR.....	444
13.1.2	PROTEÍNAS DE LA COBERTURA NUCLEAR	466
13.1.3	CANALES IÓNICOS	477
13.1.4	PROTEÍNAS DESMOSOMALES.....	¡Error! Marcador no definido.8
13.1.5	OTRAS PROTEÍNAS.....	488
13.1.6	OTROS GENES ASOCIADOS A MCD.....	49
13.2	IMPORTANCIA DE LA RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES	49

14 EL RNA NO CODIFICANTE	533
14.1 ncRNA: CLASIFICACIÓN.....	533
14.2 ncRNA: CARACTERÍSTICAS COMO BIOMARCADORES	555
14.3 LOS microRNAs	566
14.4 BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs.	577
14.5 LOS miRNAs EN CARDIOLOGÍA COMO BIOMARCADORES	60
14.5.1 miRNAs REGULADORES DE PROCESOS BIOLÓGICOS CELULARES EN CARDIOLOGÍA	62
15 HIPÓTESIS	666
16 OBJETIVOS	677
17 RESULTADOS	688
17.1 ARTÍCULO 1. miRNAs circulantes como biomarcadores para la detección de intolerantes a estatinas.	69
17.2 ARTÍCULO 2. La supresión de miR-16-5p protege a los cardiomiocitos humanos contra la lesión inducida por el estrés del retículo endoplásmico y el estrés oxidativo	1288
17.3 ARTÍCULO 3. Implementación de un nuevo algoritmo para la reinterpretación de variantes ambiguas en la miocardiopatía dilatada genética.....	13205
18 DISCUSIÓN	121
18.1 ARTÍCULO 1. miRNAs circulantes como biomarcadores para la detección de intolerantes a estatinas.	1222
18.2 ARTÍCULO 2. La supresión de miR-16-5p protege a los cardiomiocitos humanos contra la lesión inducida por el estrés del retículo endoplásmico y el estrés oxidativo	1288
18.3 ARTÍCULO 3. Implementación de un nuevo algoritmo para la reinterpretación de variantes ambiguas en la miocardiopatía dilatada genética.....	1322
19 CONCLUSIONES	1355
20 BIBLIOGRAFIA.....	1366
INFORME FAVORABLE DELS DIRECTORS	172

7 RESUM

Les malalties cardiovasculars ateroescleròtiques es tracten eficientment amb estatines. Aquests medicaments poden produir problemes musculars no desitjats en alguns pacients, conduint-los a l'abandonament del tractament. En aquest context, la identificació de biomarcadors que distingeixi els pacients que no toleraran les estatines és crític, i els miRNAs són candidats prometedors. Per això en el primer treball, vam identificar un conjunt de cinc miRNAs amb prou poder discriminatiu per aïllar pacients intolerants a estatines respecte pacients que les toleren adequadament. Els miRNAs tenen una funció determinant en els processos biològics cel·lulars a les miocardiopaties. L'estrès oxidatiu cel·lular està relacionat amb el desenvolupament de malalties cardiovasculars, inclosa la miocardiopatia dilatada isquèmica. El miR-16-5p s'ha associat amb l'estrès del reticle endoplasmàtic i l'estrès oxidatiu en cardiomiòcits, suggerint un efecte cardioprotector. En el segon treball vam confirmar ATF6 com un gen diana de miR-16-5p en una línia cel·lular cardíaca humana, i vam demostrar el seu paper en la protecció cardíaca contra l'estrès del reticle endoplasmàtic i l'estrès oxidatiu. La miocardiopatia dilatada és una entitat heterogènia que pot causar insuficiència cardíaca i arítmies malignes, amb una proporció significativa de casos d'origen genètic. Una actualització exhaustiva de les variants genètiques de significat incert en pacients amb miocardiopatia dilatada va revelar la reclassificació d'un 12% de les variants, el que subratlla la importància de la interpretació de variants genètiques de manera contínua en aquesta malaltia, ajudant a obtenir un diagnòstic genètic definitiu així com a identificar precoçment familiars portadors del mateix defecte genètic i, per tant, en risc de patir la malaltia.

8 RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas son tratadas eficientemente con estatinas. Estos medicamentos pueden producir problemas musculares no deseados en algunos pacientes conduciéndolos al abandono del tratamiento. En este contexto, la identificación de biomarcadores que distingan a los pacientes que no toleraran las estatinas es crítica, y los miRNAs son candidatos prometedores. Así, en el primer trabajo identificamos un conjunto de cinco miRNAs con suficiente poder discriminativo como para diferenciar pacientes intolerantes a estatinas frente a aquellos que los toleran adecuadamente. Los miRNAs tienen un rol determinante en los procesos biológicos celulares en las miocardiopatías. El estrés oxidativo celular está relacionado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluida la miocardiopatía dilatada isquémica. El miR-16-5p se ha asociado con el estrés del retículo endoplásmico y el estrés oxidativo en cardiomiocitos sugiriendo efecto cardioprotector. En el segundo trabajo, confirmamos ATF6 como un gen diana de miR-16-5p en una línea celular cardíaca humana y demostramos su papel en la protección cardíaca contra el estrés del retículo endoplasmático y el estrés oxidativo. La miocardiopatía dilatada es una entidad heterogénea que puede causar insuficiencia cardíaca y arritmias malignas, con una proporción significativa de casos de origen genético. Una actualización exhaustiva de las variantes genéticas de significado incierto en pacientes con miocardiopatía dilatada reveló la reclasificación de un 12% de las variantes. Ello subraya la importancia de la interpretación de variantes genéticas de manera continua en esta enfermedad, ayudando a obtener un diagnóstico genético concluyente, así como identificar precozmente a familiares portadores de la alteración genética y, por tanto, en riesgo de padecer la enfermedad.

9 ABSTRACT

Atherosclerotic cardiovascular diseases are efficiently treated with statins. These medications can cause unwanted muscle problems in some patients, leading them to discontinue treatment. In this context, the identification of biomarkers that distinguish patients who will not tolerate statins is critical, and miRNAs are promising candidates. Thus, in the first work, we identified a set of five miRNAs with sufficient discriminative power to isolate statin-intolerant patients from those who tolerate them adequately. Cellular oxidative stress is related to the development of cardiovascular diseases, including ischemic dilated cardiomyopathy. The miR-16-5p has been associated with endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cardiomyocytes, suggesting a cardioprotective effect. In the second work, we confirmed ATF6 as a target gene of miR-16-5p in a human cardiac cell line, supporting its role in cardiac protection against endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. Dilated cardiomyopathy is a heterogeneous entity that can cause heart failure and malignant arrhythmias, with a significant proportion of cases of genetic origin. A comprehensive update of genetically uncertain variants in patients with dilated cardiomyopathy revealed the reclassification of 12% of variants, underscoring the importance of continuous genetic variant interpretation in this disease, aiding to obtain a conclusive genetic diagnosis as well as in early identification of relatives carrying the genetic alteration and, therefore at risk of suffer the disease.

10 INTRODUCCIÓN

11 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la principal causa de defunción a escala mundial según la Organización Mundial de la Salud representando 17,9 millones de muertes anuales [1] y siendo las enfermedades más costosas para los sistemas de salud. Las ECVs pueden clasificarse en cuatro grandes grupos; un primer grupo son las enfermedades de las arterias coronarias (CAD) que representan entre un tercio y la mitad de los casos de ECVs. Se caracterizan por la presencia de estenosis, mayor del 75%, en alguna de las arterias coronarias principales con una disminución de la perfusión miocárdica que causa angina, infarto de miocardio o finalmente insuficiencia cardíaca (IC). Los otros tres grupos lo forman las enfermedades cerebrovasculares, (donde se incluyen los accidentes cerebrovasculares y los ataques isquémicos transitorios), las enfermedades de las arterias periféricas, que pueden provocar claudicación y el grupo de la aterosclerosis aórtica en que se incluyen los aneurismas torácicos y abdominales.

La aterosclerosis es un denominador común en la fisiopatología de todas las patologías cardiovasculares. La aterosclerosis es el proceso patogénico en las arterias que consiste en la estenosis de los vasos sanguíneos lo que conlleva a la disminución o ausencia de flujo sanguíneo [2]. La dislipidemia, los fenómenos inmunológicos y la disfunción endotelial son factores desencadenantes de la formación de la estría grasa propia de la placa aterosclerótica [3] Este proceso comprende el engrosamiento de la capa íntima con la posterior acumulación de macrófagos cargados de lípidos (células espumosas) y matriz extracelular, seguido de la agregación y proliferación de células del músculo liso que constituyen la formación de la placa de ateroma [4].

Existen factores de riesgo como las rutinas sedentarias, el tabaquismo, o las dietas hipercalóricas descompensadas en grasas saturadas y azúcares, que se han asociados al desarrollo de aterosclerosis y otros trastornos como la diabetes mellitus, el síndrome metabólico o la hipertensión, todos ellos prevalentes en individuos con ECV [5][6].

La presentación clínica de las ECVs abarca desde el paciente asintomático hasta cuadros de dolor torácico compatible con síndrome coronario agudo, equivalentes isquémicos, cuadros neurológicos en pacientes con accidente cerebrovascular agudo o claudicación intermitente en pacientes con enfermedad arterial periférica. La evaluación de la historia clínica así como un examen físico son claves para el diagnóstico de la ECV. Una historia clínica compatible con el cuadro isquémico coronario, angina, disminución de la tolerancia al ejercicio físico, ortopnea, disnea paroxística nocturna, claudicación intermitente o imposibilidad o déficit neurológico deben ser indicios para al especialista de la necesidad de realizar pruebas diagnósticas más precisas como el electrocardiograma (ECG), pruebas de imagen o estudios bioquímicos.

Además del diagnóstico basado en la sospecha clínica, la prevención primaria debe prevalecer ante individuos que presentan factores de riesgo cardiovasculares y la reducción de los factores de riesgo modificables. La adquisición de hábitos alimentarios saludables, evitar el sobrepeso y realizar actividad física periódica son hábitos de vida saludables con gran impacto en esta población. Estas medidas de prevención son válidas para todo paciente y, muy en particular para aquellos con antecedentes familiares de ECVs. Las guías de Práctica Clínica determinan las concentraciones plasmáticas objetivo de colesterol y cada una de sus fracciones, así como el uso de estatinas como medicamento de prevención [7]. Especial valoración merecen el paciente diabético o con hipercolesterolemia familiar.

El uso de marcadores inflamatorios y otros métodos de evaluación de riesgo como la puntuación de calcificación de las arterias coronarias a través del score de Agaston están bajo investigación y tienen aplicaciones limitadas, por lo que su uso no debe reemplazar la identificación de personas con factores de riesgo conocidos; sin embargo, estos recursos siguen siendo herramientas prometedoras en prevención primaria al detectar personas con aterosclerosis subclínica en riesgo de ECV [8].

Según datos de la Fundación Española del Corazón, la hipercolesterolemia es la entidad causante de aproximadamente una cuarta parte de la mortalidad por ECV, provocando en nuestro país el 24,6% y 22,5% de los fallecimientos en hombres y mujeres respectivamente.

11.1 FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

En las últimas décadas, las tasas de mortalidad cardiovascular han disminuido en los países desarrollados gracias a una combinación de prevención primaria y secundaria. Estas medidas han permitido alcanzar tasas de incidencia de ECVs reducidas junto con mejores estrategias individuales de intervención sanitaria tras los eventos cardiovasculares [9]. Los factores de riesgo modificables como el índice de masa corporal elevado, la presión arterial elevada, el colesterol lipoproteína de baja densidad (LDLc), el tabaquismo y la diabetes contribuyen significativamente a aumentar la prevalencia e incidencia de estas enfermedades. Sin embargo, el grado de influencia de estos factores puede variar entre diferentes poblaciones y según los métodos de estudio utilizados [10][11]. En la actualidad, para la cuantificación del riesgo se utilizan estos factores de riesgo cardiovascular, asignándoles diferentes ponderaciones, para así estimar el riesgo de desarrollar ECVs a 10 años vista [12][13]. Es importante destacar que estos factores de riesgo cardiovascular se asocian de manera diferente con impacto cardiovascular y no cardiovascular. Por ejemplo, el tabaquismo está fuertemente vinculado a la mortalidad prematura, mientras que la presión arterial y el colesterol elevados están más específicamente relacionados con las ECVs [14].

El Consorcio Mundial de Riesgo Cardiovascular realizó un estudio [6] el cual reveló que la prevalencia de los factores de riesgo modificables (el índice de masa corporal alto, la presión arterial elevada, el LDLc, el tabaquismo y la diabetes mellitus), la incidencia de ECV y la mortalidad, en general presentaban variaciones notables entre diferentes regiones geográficas del mundo. Se confirmó que las mujeres tenían tasas de eventos más bajas en comparación con los hombres. En conjunto, estos cinco factores de riesgo modificables fueron responsables del 57,2% de la carga de ECVs en mujeres y del 52,6% en hombres. Asimismo, representaron el 22,2% de la mortalidad total en mujeres y el 19,1% en hombres. Estas fracciones atribuibles a la población variaron según la región geográfica tanto para las ECVs como para la mortalidad en general. Se identificó que la presión arterial sistólica elevada parece ser el factor que contribuye más significativamente a la fracción atribuible a las ECVs en todas las regiones. Por lo tanto, el diferente impacto de los factores de riesgo

cardiovascular en la ECV varía según las diferentes situaciones geográficas [10][15]. La presión arterial alta, en particular, se vincula con hasta el 13.5% de todas las muertes anuales a nivel mundial y se considera el principal factor de riesgo para ECVs [16]. El control riguroso de la presión arterial, manteniendo una presión arterial sistólica por debajo de 120 mmHg, se asocia con tasas menores de eventos cardiovasculares y mortalidad general [17]. Se ha descrito también una fuerte asociación entre el colesterol no HDL (no-HDLc), la incidencia de ECVs [18] y la mortalidad [19][20]. Esto sugiere que, aunque concentraciones muy bajas de no HDLc pueden reducir eventos de ECVs [21][22], niveles extremadamente bajos pueden estar relacionados con tasas más altas de mortalidad general a largo plazo [23]. El peso de los parámetros índice de masa corporal y tabaquismo como factores de riesgo no queda claramente establecido, existiendo una relación con las características de la población de estudio [5][6]. Otros factores también influyen en el riesgo de ECVs tales como factores ambientales y exposómicos como la actividad física [10], el consumo de alcohol [24], la contaminación del aire [25], el clima y el ruido [26], el nivel educativo [27] y factores psicosociales como la depresión [28]. La inclusión de biomarcadores y variantes genéticas podría contribuir aún más a una predicción más temprana y precisa del riesgo de ECV [29].

11.2 COLESTEROL Y ESTATINAS

Numerosos estudios han demostrado de forma consistente la relación lineal entre las concentraciones LDLc y el riesgo de ECVs [30][31][32][33][34][35]. Más aun, estudios de aleatorización mendeliana han confirmado que la exposición a largo plazo a concentraciones plasmáticas elevadas de LDLc está asociada con un riesgo mucho mayor de sufrir eventos cardiovasculares si se compara con la exposición a corto plazo o en menor concentración de LDLc [32]. Estos datos proporcionan con una evidencia robusta que las LDLc tienen un efecto causal y acumulativo sobre el riesgo de padecer una ECV, estando determinado por la magnitud absoluta y la duración total de la exposición [30]. Así, las concentraciones de LDLc son un factor causal de las ECVs siendo mejor cuanto más bajas las concentraciones plasmáticas y menor el tiempo de exposición.

Según datos de la Fundación Española del Corazón, la hipercolesterolemia es la enfermedad causante de aproximadamente una cuarta parte de la mortalidad por ECVs provocando en nuestro país el 24,6% y 22,5% de los fallecimientos en hombres y mujeres respectivamente. La hipercolesterolemia se caracteriza por unos elevados niveles plasmáticos de colesterol transportado en las lipoproteínas de densidad muy baja (VLDLc), densidad intermedia (IDLc) y LDLc [37][38]. Las últimas Guías de Práctica Clínica publicadas en 2020 [39] establecen como objetivo en pacientes de muy alto riesgo vascular unos valores de LDLc <55 mg/dL (<1.4 mmol/L) o al menos una reducción del 50% de la concentración basal [39]. Estas recomendaciones, muy exigentes, están muy lejos aún de alcanzarse.

La terapia hipolipemiente de referencia en todas las Guías de Práctica Clínica para alcanzar estas concentraciones objetivo de LDLc se basa fundamentalmente en las estatinas. Estas son el principal tratamiento en la prevención cardiovascular primaria y secundaria, y actúan a través de la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril Co-A reductasa (HMG-CoAR), la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol [40]. Sin embargo, en determinados pacientes de elevado riesgo vascular, si estos objetivos no se alcanzan, las propias Guías de Práctica Clínica recomiendan la utilización de potentes agentes hipolipemiantes no estatínicos como son los anticuerpos monoclonales inhibidores de la proteína PCSK-9 (iPCSK-9), evolocumab o alirocumab [41]. Se ha descrito que bajos niveles de concentración plasmática de PCSK-9 están asociados con una reducción de los niveles de LDLc. La PCSK-9 se une al receptor de la LDL (LDL-R) en la superficie de los hepatocitos induciendo la endocitosis de este receptor y su posterior degradación dentro de la célula [42]. La inhibición de la PCSK-9, mediante estos anticuerpos monoclonales, impide la degradación intracelular del LDL-R y permite que este regrese a la superficie celular donde continuará captando LDLc [43]. La terapia conjunta de estatinas con evolocumab o alirocumab reduce los niveles del LDLc de forma significativa hasta un 46-73% disminuyendo drásticamente el riesgo de eventos cardiovasculares [44].

La *European Medicine Agency* [45] define la intolerancia a estatinas como la incapacidad para tolerar al menos dos o más estatinas a una dosis diaria inferior a la aprobada en ficha técnica por síntomas relacionados con el músculo esquelético, como, por ejemplo, dolor, debilidad o calambres que hayan comenzado o

aumentado durante la terapia con estatinas y hayan remitido al suspender el tratamiento. La *National Lipid Association* [46] la define como la presentación de aquellos síntomas adversos, signos o anomalías de laboratorio atribuidos por el paciente a la toma de estatina; en la mayoría de los casos, se percibe como una interferencia inaceptable que limita con las actividades de la vida diaria y que conducen a la detención o reducción del tratamiento. El *Canadian Working Group Consensus* [47] realiza una descripción más amplia de efectos secundarios incluyendo síntomas no específicos leves o efectos secundarios transitorios tales como molestias gastrointestinales, fatiga, afectación de la piel y deterioro neurocognitivo, -muy discutido, y no aceptado por los resultados obtenidos en diferentes metaanálisis realizados de forma sistemática-, además de ocasionalmente la aparición de proteinuria [48][49]. Adicionalmente, se ha descrito que el tratamiento prolongado con estatinas podría incrementar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 [50] principalmente con dosis altas o en presencia de otros factores de riesgo relacionados como el sobrepeso o la resistencia a la insulina [51]. No obstante, se considera aceptado de forma universal que su diabetogenicidad no contraindica su utilización dado el beneficio cardiovascular demostrado por las mismas [39][51][52]. La presencia de estos síntomas adversos conduce a la falta de adherencia a la terapia con estatinas en este subgrupo de elevado riesgo cardiovascular. Ello resulta en un control inadecuado de las concentraciones de LDLc y en un riesgo cardiovascular aumentado en una población sensible y expuesta. De hecho, se ha confirmado que pacientes sin adherencia a estatinas presentan una supervivencia inferior que aquellos que la toman días alternos [53]. Por otro lado, es destacable que algunos de los síntomas que describen estos pacientes no están relacionados con el uso de estatinas, especialmente en aquellos con reacciones atípicas después de períodos largos de tratamiento [54][55]. Estos falsos positivos clínicos o “autodiagnosticados” en un elevado número de casos son individuos de alto y muy alto riesgo cardiovascular presentan igualmente una elevada tasa de abandono del tratamiento con estatinas. Por ello, es de gran relevancia clínica diseñar un enfoque práctico que permita confirmar a los “verdaderos” intolerantes a estatinas (IE).

La prevalencia de IE alcanza hasta un 15-20% [56] en la práctica clínica diaria. Si bien esta prevalencia es variable debido a la dificultad de estudio que presenta este

grupo de pacientes y la falta de homogeneidad en su definición y de herramientas para su diagnóstico. De acuerdo con la *European Atherosclerosis Society*, un 29% del total de pacientes tratados con estatinas pueden presentar síntomas asociados con las mismas [57].

11.3 SÍNTOMAS MUSCULARES ASOCIADOS A LAS ESTATINAS

En la práctica clínica, los efectos musculares adversos derivados del tratamiento con estatinas (SAMS) son los más frecuentes, generando serias limitaciones en el manejo terapéutico de estos pacientes. De hecho, los SAMS son una de las principales razones de la falta de adherencia y/ o la suspensión del tratamiento de estas [58]. Entre los SAMS se describen cuatro formas principalmente, mialgia, miopatía, miositis y rabdomiólisis [59]. En un trabajo que incluyó casi 8000 pacientes franceses con dosis variables de diferentes estatinas se estimó la presencia de síntomas adversos musculares en relación con las estatinas en un 10.2% y un abandono del tratamiento del 30% [60]. Sin embargo, un meta-análisis que incluyó 22 estudios aleatorios con más de 1000 participantes y seguimiento superior a un año presenta datos contradictorios. Este trabajo no evidencia diferencias significativas en relación con la miopatía o abandono del tratamiento en el brazo del placebo o de estatinas [61][62]. A día de hoy existen solo dos estudios aleatorios que como objetivo primario han valorado los efectos adversos asociados a las estatinas [63], estimando la presencia de SAMS en torno al 5%. En uno de estos estudios se demostró una leve elevación de los niveles de la creatinina quinasa incluso en pacientes asintomáticos, confirmando hasta un 30% de los pacientes con toxicidad muscular y la dificultad que presentaba el estudio de esta población [64].

Un único estudio aleatorio, hasta la fecha, ha relacionado los síntomas musculares en los IE y el papel de la coenzima Q10, cuya suplementación reduce el daño muscular [65]. Por su parte, el estudio DAMA confirmó la mialgia como la presentación más frecuente en IE [66]. En 2014, la Asociación Nacional de Lípidos propuso el índice clínico de mialgias secundarias a estatinas para aportar un sistema de puntuación en la práctica clínica, y así determinar la probabilidad de la relación entre los síntomas musculares y las estatinas [55].

Fisiopatológicamente, además de la coenzima Q10, estudios preclínicos han demostrado que las estatinas disminuyen la función mitocondrial, atenuando la producción de energía y alterando la degradación de las proteínas musculares, proporcionando así un posible vínculo entre las estatinas y los síntomas musculares [67][68]. A pesar de estos datos tan prometedores, queda sin esclarecer cuál es el mecanismo fisiopatológico subyacente en pacientes con SAMS. El bajo índice de estudios en IE, la falta de un grupo control definido y la ausencia de homogeneidad en la definición de esta entidad entre las diferentes Sociedades Médicas dedicadas al estudio de dislipidemias dificulta el diagnóstico de los IE. Todo ello potenciado por la ausencia de herramientas diagnósticas clínicamente accesibles o certeras impide abordar este problema tan frecuente en la práctica clínica diaria [69]. Así la necesidad de la búsqueda y desarrollo de nuevos biomarcadores que ayuden o simplifiquen el diagnóstico de esta población de elevado riesgo cardiovascular es crucial.

12 FISIOLÓGÍA DE LAS MIOCARDIOPATÍAS

Una miocardiopatía (MC) se define como un trastorno en el músculo cardíaco (miocardio) donde hay anomalías estructurales y funcionales, sin la presencia de enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, enfermedad valvular o enfermedad cardíaca congénita que sea suficiente para causar las alteraciones observadas en el músculo cardíaco [70]. Esta definición es válida tanto para edades pediátricas como en edad adulta, y no realiza suposiciones previas sobre la causa subyacente, que podría ser genética, hereditaria o adquirida. Las MCs denominadas secundarias pueden presentarse junto con enfermedades isquémicas, valvulares e hipertensivas, y es importante destacar que la presencia de una de estas condiciones no descarta la posibilidad de tener otra.

Recientemente se actualizó la clasificación clínica de las MCs [71] para incluir nuevas descripciones fenotípicas centrándose en las características morfológicas y funcionales del miocardio. Además se constata que diferentes fenotipos de MCs pueden coexistir en una misma familia y que la progresión de la enfermedad en un paciente individual puede incluir la evolución de un fenotipo de MC a otro. Con ello se rompe con la clasificación aceptada hasta ahora donde las características fenotípicas de las distintas MCs eran poco amplias (Figura 1).

Las novedades propuestas para describir los fenotipos de la MC radican en la inclusión específica de rasgos de caracterización del tejido miocárdico como el cicatrizado ventricular no isquémico o el reemplazo graso. Estos pueden presentarse con o sin dilatación ventricular, anomalías en el movimiento de la pared o disfunción global del corazón durante la contracción o relajación. Es crucial reconocer este fenotipo, ya que podría ser la única pista para diagnosticar una MC, y su significado pronóstico varía según la causa subyacente. También se añade la dilatación de las aurículas (tanto izquierda como derecha) como hallazgo clínico adicional importante en la descripción fenotípica de las MCs.

Esta nueva propuesta insta a considerar la MC como la causa de diversas presentaciones clínicas (por ejemplo, arritmias o IC, entre otras) no excluyentes

entre sí, aunque se recomienda basar el diagnóstico en el fenotipo cardíaco predominante en la evaluación clínica.

La mayor novedad es considerar las MCs en dos grandes categorías principales. Las MCs con anomalías puramente estructurales y aquellas “MCs arritmogénicas” que incluyen a un grupo de condiciones que presentan anomalías estructurales y funcionales del miocardio (identificadas mediante imágenes cardíacas y/o investigaciones patológicas macroscópicas y microscópicas) así como arritmias ventriculares. Esta clasificación actualizada responde a la necesidad de dar respuesta a la evidencia de la superposición clínica y genética entre las MCs del ventrículo derecho (VD) y del ventrículo izquierdo (VI) [72].

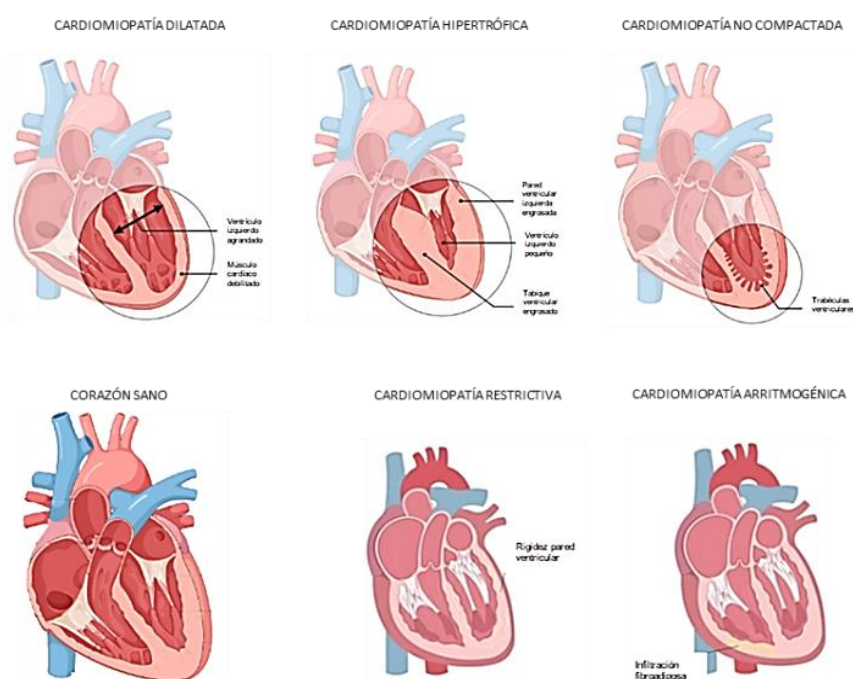


Figura 1. Anomalías estructurales del miocardio asociadas a las diferentes miocardiopatías.

12.1 MIOCARDIOPATÍA DILATADA

La miocardiopatía dilatada (MCD) se caracteriza por una dilatación del VI (puede afectar al ventrículo derecho pero no es requerimiento diagnóstico) y disfunción sistólica no atribuible a condiciones de sobrecarga de presión o de volumen (hipertensión, valvulopatía o cardiopatía congénita) ni a enfermedad coronaria (CAD) [73]. En casos excepcionales, la dilatación del VI puede ocurrir incluso con una

fracción de eyección (FE) normal, sin la influencia del remodelado atlético u otros factores ambientales.

Esta enfermedad es una de las principales causas de IC y los pacientes pueden sufrir arritmias auriculares o ventriculares e incluso muerte súbita cardíaca (MSC) [74]. Los casos más graves requieren de dispositivos externos de asistencia circulatoria o incluso, en última instancia, un trasplante cardíaco. Se estima que la prevalencia de MCD en edad adulta es de 1:2500 pacientes y es del 0.026% en niños [75] y su incidencia es de 7 casos por cada 100.000 personas por año [76][77]. Durante la progresión de la enfermedad, el VI sufre cambios morfológicos y funcionales adversos (también llamado remodelado) reflejando un largo período de progresión de la enfermedad, presente casi en la mitad de los pacientes con MCD [78].

La MCD abarca una amplia variedad de trastornos genéticos o adquiridos, y se debe realizar una exhaustiva evaluación diagnóstica para identificar la causa subyacente. Posteriormente, se debe considerar un enfoque terapéutico orientado a la etiología. Aun así, no existe un consenso en cuanto a la clasificación de la MCD basada en su etiología y se considerará idiopática según los criterios clínicos mientras no se encuentre un posible origen tras la aplicación de un exhaustivo protocolo diagnóstico.

La *American Heart Association* clasifica la MCD como primaria o idiopática (origen no conocido), secundaria (asociada a condiciones preexistentes como hipertensión arterial, enfermedad coronaria, infecciones virales, entre otras), familiar (origen genético) e inflamatoria (infecciones víricas u otras causas) [79]; mientras que la *European Society of Cardiology* [71] agrupa esta MC en formas familiares (es decir, genéticas) o no familiares (no genéticas) [80].

Se han identificado varios parámetros que determinan la situación clínica y establecen una estratificación pronóstica en pacientes afectados por MCD. Cabe destacar entre ellas la presencia de disfunción sistólica basada en la alteración de la FE del VI y la clase funcional de la *New York Heart Association* (NYHA) que determina clínicamente la situación del paciente (Tabla 1) [81][82]. Otros indicadores a considerar de mal pronóstico en pacientes de MCD son la presencia de un patrón

diastólico alterado grado II o III, la dilatación severa de la aurícula izquierda, la presencia de hipertensión pulmonar, la presencia de un bloqueo de rama izquierda o la disfunción del VD [83]. Sin embargo, su progresión o regresión durante el seguimiento parece ser la herramienta pronóstica más útil [84].

Tabla 1. Clasificación de la insuficiencia cardíaca de la *New York Heart Association* (modificado de *Lapu-Bula et al 1998* [81]).

Clase I	Sin síntomas y sin limitación en la actividad física ordinaria, como dificultad para respirar al caminar o subir escaleras.
Clase II	Síntomas leves y ligera limitación durante la actividad ordinaria.
Clase III	Limitación marcada en la actividad debido a síntomas, incluso durante actividades ordinarias como caminar distancias cortas.
Clase IV	Limitaciones severas y el paciente experimenta síntomas incluso en reposo.

La medida precisa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) es crucial en el manejo de pacientes con MCD determinando un peor pronóstico en pacientes con una FEVI más deprimida. Se ha demostrado que la FEVI severamente deprimida, es un factor de riesgo MSC [85].

Antes de diagnosticar una MCD es necesario excluir condiciones con superposición fenotípica. Un abordaje integral y protocolizado de los pacientes con MCD recién diagnosticados, definiendo su etiología, es esencial para lograr una estratificación pronóstica temprana precisa. Los signos y síntomas de IC caracterizan el inicio clínico de la enfermedad, si bien los individuos jóvenes pueden permanecer asintomáticos durante mucho tiempo a pesar de tener una disfunción del VI. Esta fase silente puede progresar hacia anomalías cardíacas leves como dilatación aislada del VI, disfunción sistólica en el límite inferior de la normalidad o eventos arritmogénicos. La fase manifiesta de la disfunción sistólica generalmente se asocia con la dilatación del VI, pero esto puede estar ausente en algunos casos causando confusión diagnóstica [86]. Por tanto, en este contexto se debe hacer todo lo posible para obtener un diagnóstico etiológico con herramientas tales como la resonancia magnética cardíaca (RMC), la biopsia endomiocárdica o biomarcadores, entre otros,

con el objetivo de personalizar el manejo terapéutico del paciente según la causa específica.

El diagnóstico de MCD se realiza tras la valoración clínica y exploración del paciente sobre un protocolo de pruebas diagnósticas comenzando con el ECG. Aunque en pacientes con MCD éste puede ser normal lo habitual es que esté alterado. Dentro de las anomalías probables destacan los cambios aislados de la onda T, alteraciones de la repolarización o trastornos de conducción como el bloqueo de rama izquierda. El paciente con MCD puede presentar taquicardia sinusal y arritmias supraventriculares; en torno al 20 a 30% de los pacientes tienen taquicardia ventricular no sostenida. No existe un patrón patognomónico en el ECG que determine un patrón morfológico o funcional para cada etiología o proceso causal, ni ayuda al diagnóstico de los diferentes estadios clínicos de esta entidad [87].

La ecocardiografía transtorácica (ETT) tiene un papel importante en la evaluación diagnóstica y pronóstica de la MCD. Esta técnica valora la dilatación del VI, el deterioro de la función sistólica y el patrón diastólico trasladando indirectamente información sobre las presiones telediastólicas del VI. La ETT tiene la principal ventaja de estar ampliamente disponible en centros sanitarios, ser asequible y no invasiva lo que la convierte en la herramienta perfecta para el diagnóstico de primera línea y el seguimiento de los pacientes con MCD. Entre las desventajas de la ETT destacan la variabilidad intra e interobservador y que raramente alcanza un diagnóstico etiológico. Técnicas ecocardiográficas desarrolladas hace varios años como el Doppler Tisular o el *Strain* resultan de utilidad en el estudio de la MCD. Así, la valoración de las ondas S', E' y A', tanto a nivel del anillo septal como lateral, permite complementar la información de la función diastólica del paciente y estimar indirectamente las presiones telediastólicas del VI.

Con los avances tecnológicos, varios estudios han abordado el papel de la RMC como una modalidad funcional en el diagnóstico y cuantificación de la función cardíaca en diferentes tipos de MCs [88]. La RMC tiene una alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo en su diagnóstico siendo considerada en la actualidad la prueba *gold-standar* [89]. Esta técnica de imagen permite cuantificar con precisión las dimensiones de las cámaras, los volúmenes y la función sistólica del VI siendo de utilidad para el pronóstico del paciente. Además se han descrito

determinados patrones de captación de contraste que permiten sugerir la etiología causal aunque no la confirman. Por el contrario, el potencial de la RMC para integrarse de manera óptima en la práctica clínica se ha visto limitado en parte por el largo tiempo total de exploración, los agentes de contraste utilizados y la presencia de determinados dispositivos metálicos que impiden la realización de esta prueba [90].

Por otro lado, el papel de la biopsia endomiocárdica en el diagnóstico de MCD sigue siendo controvertida y su aplicación está limitada debido a su alta invasividad y a la poca precisión en ciertos escenarios [91].

El estudio genético se realiza en individuos con fenotipo claro de MCD y con antecedentes familiares, pero está ampliamente recomendado en pacientes con MCD y antecedentes familiares de MSC, o en individuos que presentan características clínicas de una enfermedad genética particular/rara (como bloqueo auriculoventricular, disfunción del seno, elevación de la creatina fosfoquinasa, disfunción sistólica severa -FEVI < 35%-) o arritmia maligna (por ejemplo, taquicardia ventricular sostenida/fibrilación ventricular) o fenotipos que puedan superponerse con una causa genética, como la MC periparto o alcohólica. El diagnóstico genético de la MCD es uno de los temas que aborda este proyecto de tesis.

12.2 FISIOPATOLOGÍA CELULAR EN MCD

Se ha demostrado que una amplia gama de procesos celulares y biológicos participan en el daño cardiovascular como la apoptosis [92], el estrés del retículo endoplásmico (RE), la autofagia y el estrés oxidativo [93][94]. Hasta hace pocos años no se había considerado la etiología de la MCD en este estudio molecular. El estudio de estos procesos ha permitido abrir las posibilidades de potenciales dianas terapéuticas.

12.2.1 APOPTOSIS

La apoptosis se inicia y ejecuta a través de dos vías de señalización principales: las vías intrínseca y extrínseca (Figura 2). La vía de apoptosis intrínseca, también

denominada vía de apoptosis mitocondrial, se desencadena por estrés intracelular como estrés oxidativo, sobrecarga de calcio y daño del ADN lo que lleva a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial dependiente de Bax/Bak y a la liberación de citocromo c (Cit C) de las mitocondrias hacia el citosol [95]. El Cit C citosólico y el factor de activación de proteasa apoptótica 1 forman el apoptosoma y dan como resultado la activación de la caspasa 9 [96]. Por su parte, la apoptosis extrínseca se inicia por señales de estrés extracelular que incluyen el factor de necrosis tumoral- α , el Fas ligando y el ligando inductor de apoptosis relacionada con TNF (TRAIL) mediante la unión a sus receptores individuales [97][98]. Estos reclutan el dominio de muerte asociado a Fas, FADD, y la procaspasa 8 en el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que conduce a la activación de la caspasa 8. Las caspasas iniciadoras activadas 9 u 8 inducen además la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, lo que da como resultado la escisión de los sustratos celulares esenciales y, finalmente, la muerte apoptótica del cardiomiocito [99].

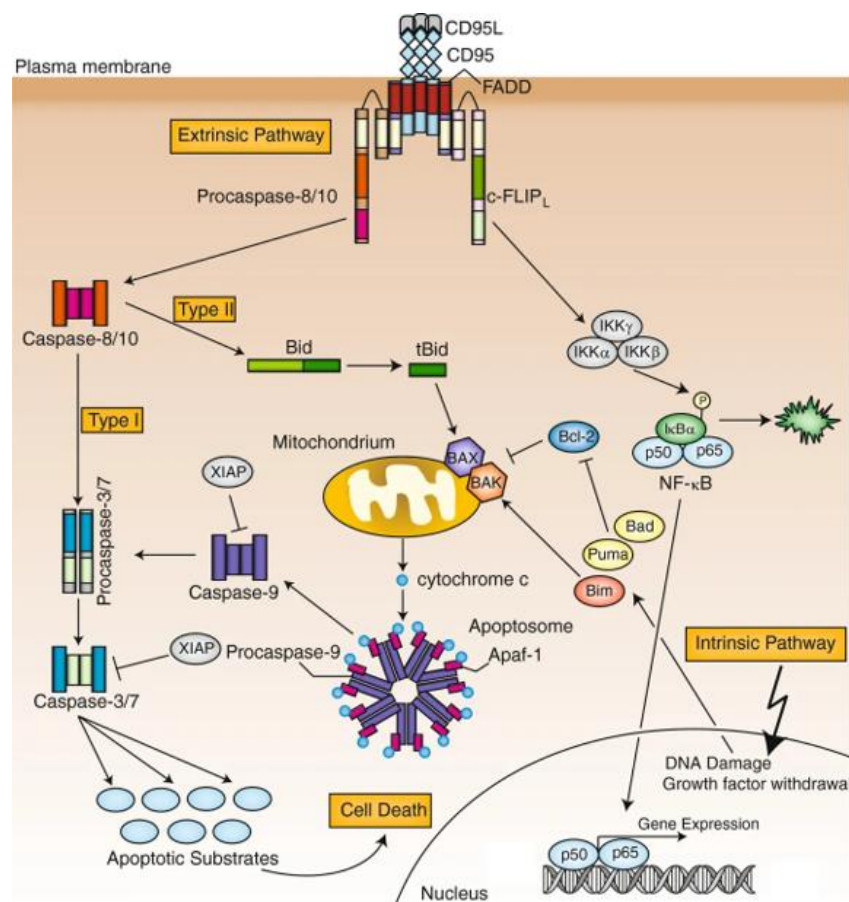


Figura 2. Esquema de las vías extrínseca e intrínseca de activación de la apoptosis. Imagen tomada de Schleich et al.2013 [100].

La apoptosis es esencial durante el desarrollo del corazón y se ha relacionado con ECVs como la cardiopatía isquémica, la lesión por reperfusión, la MC inducida por quimioterapia y la IC [93]. Sin embargo, actualmente no hay un tratamiento clínicamente aplicable dirigido a este proceso celular. Para ayudar a identificar posibles direcciones innovadoras para la investigación futura es necesario tener un conocimiento completo de las vías apoptóticas funcionales en los miocitos cardíacos.

12.2.2 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El RE es un orgánulo que se encuentra en el citoplasma de las células eucariotas. Está compuesto por un sistema de membranas interconectadas entre sí que comparten el mismo espacio interno. Es responsable de la traducción de proteínas de membrana, de la modificación postranscripcional de proteínas ayudando a su plegado y transporte, del mantenimiento de la homeostasis del calcio celular (Ca^{2+}) y de la biosíntesis de lípidos. Los ribosomas, presentes en el RE rugoso participan en la síntesis y secreción de proteínas. El RE liso carece de ribosomas unidos, por lo tanto, es ineficaz en la síntesis de proteínas; si bien es importante para la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos, metabolismo de carbohidratos, ensamblaje de bicapas de lípidos y regulación de la homeostasis del Ca^{2+} . El tipo de célula, la función de la misma y sus necesidades determinan el papel de RE.

El RE es extremadamente sensible a factores estresantes. Afecciones fisiológicas y patológicas como manifestación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [101], isquemia / reperfusión, perturbaciones en la homeostasis del Ca^{2+} y la liberación de citosinas y toxinas inflamatorias pueden conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas en la luz del RE, una condición conocida como estrés del RE [102]. Diversas señales ocasionan el estrés del RE. Cuando eso sucede, el RE provoca una respuesta protectora o adaptativa llamada respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) con el objetivo de restaurar la homeostasis del RE [103]. La regulación homeostática del plegamiento de proteínas en el RE está bajo el control de tres vías conservadas evolutivamente [102]: un activador del factor de transcripción 6 (ATF6), una enzima requeridora de inositol (IRE1) y una quinasa dependiente de RNA de doble cadena inducida por interferón (PERK). Estos tres sensores son activados por

perturbaciones en la homeostasis celular y regulan diferentes vías transcripcionales a través de moléculas traductoras como ATF6 escindido vinculado a ATF6, XBP1s en relación con IRE 1, de las siglas en inglés *X-box binding protein 1 spliced* , y ATF4 ligado a PERK.

La activación de estas tres vías está controlada por el sistema de proteínas reguladas por glucosa (*Glucose-regulated proteins* -GRPs-), como GRP78, también conocida como proteína de unión a inmunoglobulina (*Binding immunoglobulin protein* -BiP-) una de las chaperonas más abundantes del RE (Figura 3). GRP78 está asociada con chaperonas de la familia Hsp70 y co-chaperonas de la familia Hsp40 [104]. Esta proteína interviene en muchos procesos celulares, incluyendo la translocación de polipéptidos recién sintetizados a través de la membrana del RE, facilitando el plegamiento y ensamblaje de las proteínas recién sintetizadas, manteniendo las proteínas en un estado competente para el posterior plegamiento, la oligomerización y la regulación de la homeostasis [105]. Además de su función de acompañamiento, GRP78 es un regulador clave de los transductores de estrés del RE. Esta chaperona tiene un dominio ATPasa y un dominio de unión a péptido, lo que ayuda a la unión y liberación de las proteínas mal plegadas. Las proteínas mal plegadas producidas en condiciones de estrés se reubican del RE al citosol y se degradan en el proteasoma [106]. Sin embargo, las proteínas mal plegadas que se acumulan provocarán estrés en el RE. La proteína desplegada compite con el receptor de unión de GRP78 con cualquiera de los receptores del RE (ATF6, IRE1 y PERK) y da como resultado la activación de la UPR. Las consecuencias de la UPR incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas, la regulación de la expresión genética [103][107] y la apoptosis [108] para corregir el estado fisiológico de la célula. La vía PERK provoca la fosforilación de eIF2 α reduciendo la acumulación de proteína en el RE y activando la sobreexpresión del factor de transcripción activador 4 (ATF4) [109]. ATF4 es muy importante ya que induce la expresión de proteínas chaperonas, como BiP, para aumentar la capacidad de plegamiento, mediar el metabolismo de aminoácidos y la síntesis de glutatión, así como para aumentar la resistencia al estrés oxidativo. ATF4 indirectamente provoca la desfosforilación de eIF2 α y recupera la síntesis de proteínas. La consecuencia de la vía PERK puede ser la apoptosis celular [107].

Por su parte, ante el estrés del RE, IRE1 se dimeriza y activa. El IRE1 activado puede desencadenar una cascada de interacciones que actúan sobre una endorribonucleasa que escinde un intrón de 26 bases del mRNA que codifica XBP1, resultando en la expresión de XBP1 activo que promueve la expresión de los genes diana de la UPR [110].

En el caso de ATF6, al separarse de GRP78, viaja al aparato de Golgi donde las proteasas del Sitio-1 (S1P) y del Sitio-2 (S2P) escinden el dominio citosólico de ATF6 de la membrana. Ello resulta en la translocación de su fragmento funcional al núcleo [111]. En el núcleo, activa un conjunto de genes de la respuesta UPR que codifican chaperonas y enzimas modificadoras de proteínas relacionadas con plegamiento de proteínas y degradación asociada al RE [106].

Estas tres vías de señalización de la UPR y el estrés del RE juegan un papel fundamental en la aparición y progresión de las ECVs [112].

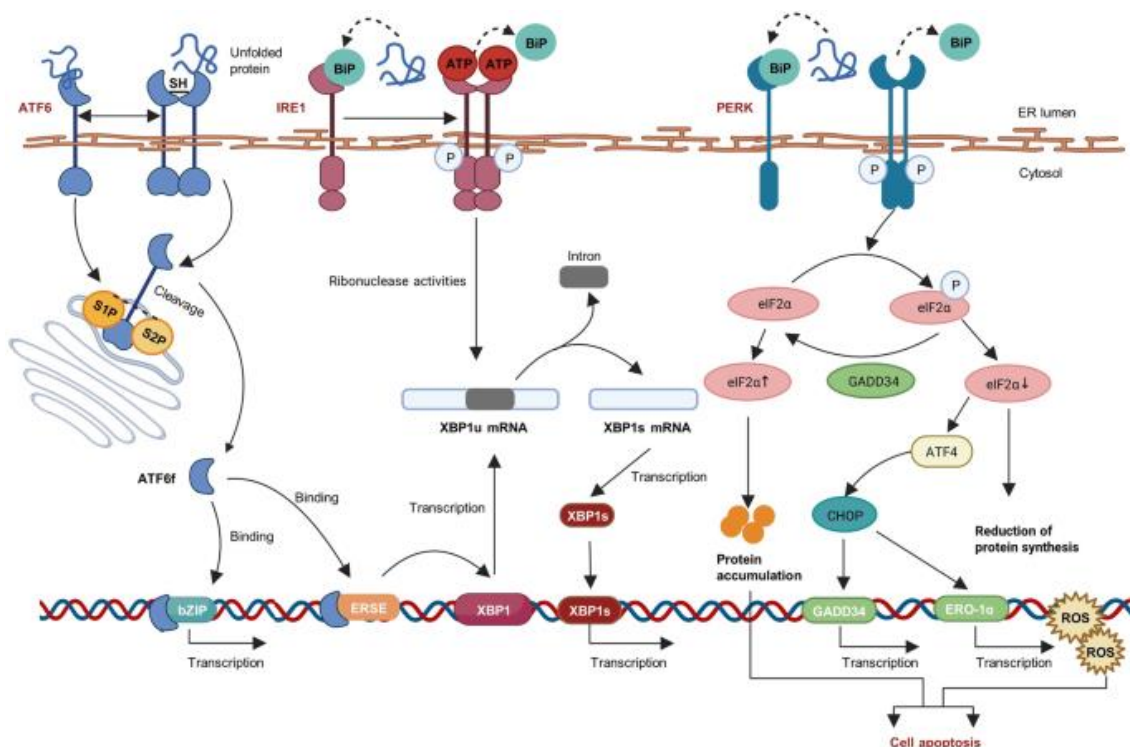


Figura 3. Rutas de activación en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas y desplegadas en el retículo endoplásmico (RE) llevarán a la liberación de BiP de PERK, ATF6 e IRE1, provocando su activación. Imagen tomada de *Chen et al. 2023* [113].

Otro mecanismo de respuesta a la UPR implica la activación de p38 MAPK, que activa la proteína homóloga del factor de transcripción C / EBP (CHOP); esto contribuye a la apoptosis causada por el estrés del RE al favorecer la generación de ROS [114]. El resultado final del estrés del RE es bien la recuperación y supervivencia o bien la apoptosis, según la gravedad y la duración de este. La señalización del estrés del RE ha mostrado un papel citoprotector para mantener la homeostasis celular, pero cuando el estrés del RE es prolongado conduce a la disfunción de los cardiomiocitos y la apoptosis.

12.2.3 AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado que implica la degradación y el reciclaje de proteínas y orgánulos presentes en exceso y/o deteriorados a través de la formación de autofagosomas y la degradación de lisosomas (Figura 4). Es un fenómeno biológico para el mantenimiento de funciones celulares básicas. Puede inducirse en respuesta a una variedad de factores estresantes como la falta de nutrientes, el estrés oxidativo y las infecciones. Los productos de degradación de la autofagia, tales como aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos libres, se pueden reciclar para la síntesis de nuevas moléculas y energía. La autofagia puede eliminar proteínas mal plegadas, metabolitos dañinos, mitocondrias envejecidas, etc., y tiene un efecto anti-envejecimiento. La autofagia tiene una importante función en el mantenimiento de la homeostasis celular [115]; sin embargo, en condiciones estresantes, como hipoxia o inanición, la autofagia se activa para promover la supervivencia celular al conservar energía y reducir las sustancias tóxicas [116].

Los tipos celulares que constituyen el tejido cardiovascular, los cardiomiocitos, células endoteliales y células musculares lisas arteriales, utilizan la autofagia para la supervivencia y en sus funciones fisiológicas. Las anomalías en los procesos autofágicos o mitofágicos identificados en modelos animales se han asociado a una mayor propensión a desarrollar espontáneamente trastornos cardiovasculares específicos, incluidas múltiples formas de miocardiopatía [117]. Además, la inhibición farmacológica o genética de la autofagia a menudo acelera la progresión de la

enfermedad y empeora el resultado de la ECV en múltiples modelos animales [117]. Por todo, la autofagia puede surgir como una diana terapéutica de relevancia clínica.

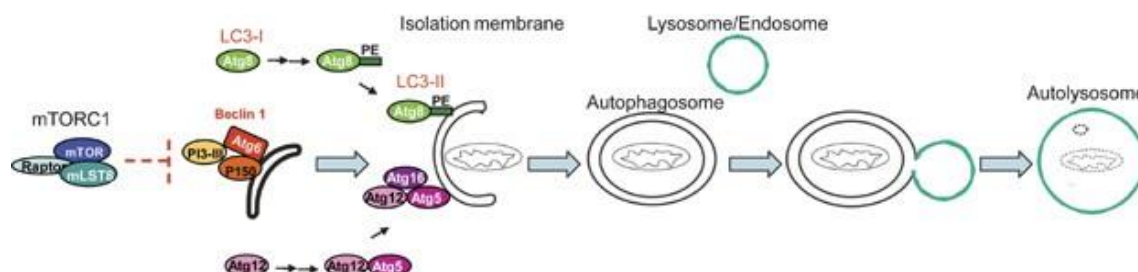


Figura 4. Esquema del proceso autofágico y su regulación. La formación del autofagosoma requiere de la participación de un complejo enzimático. Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina son esenciales para la elongación de la membrana de aislamiento. La maduración del autofagosoma ocurre al fusionarse con endosomas y lisosomas, formando un autofagolisosoma donde se degrada la carga. Imagen tomada de Høyer-Hansen et al.2007 [118].

La respuesta al estrés del RE induce autofagia con la intención de recuperar su función, degradando agregados proteicos mal adheridos e incluso porciones del propio RE disfuncional; ello se confirma a través de la detección de marcadores autofágicos como la cadena ligera 3 (LC3-II), Beclin 1 y p62 [118]. Así, bajo una sobrecarga de presión cardíaca se activa la autofagia celular, se alivia el estrés del RE y mantiene la función mitocondrial ejerciendo así un efecto protector. La inhibición de la autofagia de cardiomiocitos bajo estrés fisiológico agrava significativamente la aparición de IC. Por el contrario, bajo una sobrecarga de presión severa, la regulación positiva de *Beclin 1* induce la sobre activación de la autofagia. Esto conduce a la pérdida de orgánulos / proteínas importantes y muerte celular así como una rápida transferencia de la hipertrofia miocárdica compensadora cardíaca a la IC descompensada. De esta forma, el estrés del RE y, por tanto, la producción excesiva de ROS se alivia ejerciendo un mecanismo regulador de la homeostasis del RE.

12.2.4 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es una condición en la que la producción de ROS es alarmantemente alta y las defensas antioxidantes disponibles son limitadas; resultando en daño al ADN, proteínas, azúcares y lípidos por el exceso de radicales

libres [120]. El anión superóxido producido principalmente en las mitocondrias es un ROS primario y es un precursor de muchos ROS secundarios, incluidos el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo, el ácido hipocloroso y el radical hidropéroxilo [121]. Los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial y la α -cetoglutarato deshidrogenasa en el ciclo del ácido tricarboxílico contribuyen a la producción de ROS. También existen enzimas mitocondriales antioxidantes, que eliminan los radicales libres [122].

12.2.5 RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO, APOPTOSIS, AUTOFÁGIA Y ROS.

El estrés del RE puede desencadenar respuestas celulares como la autofagia y la apoptosis. Además, el aumento de ROS durante el estrés del RE puede contribuir tanto a la activación de la apoptosis como a la modulación de la autofagia. Estas interconexiones son esenciales para la regulación de la homeostasis celular y la supervivencia en situaciones de estrés.

El estrés del RE puede ser desencadenado por diversas condiciones como la acumulación de proteínas con una configuración tridimensional errónea, la falta de glucosa o la disfunción de las proteínas chaperonas. Cuando el RE está estresado, las células activan una respuesta adaptativa para restaurar la homeostasis.

La autofagia es un proceso celular que implica la degradación y reciclaje de componentes celulares, incluyendo orgánulos dañados o proteínas no funcionales por defectos de plegamiento estructural. Durante el estrés del RE, la autofagia puede activarse como un mecanismo para eliminar proteínas mal plegadas y restaurar la función celular. Si el estrés del RE persiste o es demasiado severo puede desencadenar la vía apoptótica.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que elimina células dañadas de manera controlada. El estrés del RE puede activar las vías apoptóticas para eliminar células que no pueden recuperarse.

El estrés del RE también puede aumentar la producción de ROS en las células. Las ROS, como se mencionó con anterioridad, por sus características altamente reactivas pueden causar daño celular y desencadenar respuestas de estrés

oxidativo. Así, el exceso de ROS puede influir en la activación de la apoptosis y la autofagia.

Hay evidencias de correlación entre el estrés del RE y la IC [123], el proceso aterosclerótico [124] y la apoptosis de cardiomiocitos inducida por isquemia [125]. Una comprensión más profunda del vínculo entre el estrés del RE, la inflamación y la autofagia en relación con las ECVs proporcionaría nuevas estrategias potenciales para la prevención y dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades cardíacas.

Además de la UPR, otras vías relacionadas con el RE colaboran con la mitocondria y el núcleo para regular las respuestas celulares. La interacción entre la formación de ROS, la alteración de la homeostasis del calcio, el colapso mitocondrial y la inflamación es un fenómeno común que existe en varios trastornos y su conexión con el estrés del RE se está explorando y requiere más investigación.

Se sabe que las mitocondrias desempeñan un papel central en muchas funciones celulares vitales, incluida la generación de energía celular en forma de ATP, el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} , la formación de ROS, la apoptosis, la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de esteroides [126]. El estrés mitocondrial caracterizado por morfología mitocondrial anormal, disfunción bioquímica y homeostasis redox alterada es una manifestación común en varias ECVs como la isquemia [127].

Los radicales libres se generan a partir de dos fuentes: la maquinaria de plegado regulada por la UPR en el RE y las mitocondrias [128][129]. Las ROS son subproductos del metabolismo celular normal que también se producen en respuesta a estrés celular. Son dañinos a altas concentraciones y beneficiosos a concentraciones moderadas y en equilibrio con los mecanismos de defensa antioxidantes celulares que mantienen la homeostasis redox celular. El RE proporciona un entorno de oxidación-plegamiento exclusivo a las proteínas para facilitar la formación de enlaces disulfuro y se cree que este proceso contribuye al 25% de las ROS generadas por la célula [130]. La heterogeneidad de la fisiopatología de la MCD, las limitaciones de las pruebas cardiovasculares por imagen, las complicaciones de la biopsia de miocardio y la falta de biomarcadores

específicos para confirmar la etiología crean la necesidad de enfoques novedosos para identificar los mecanismos celulares fisiológicos y patológicos que apoyen la toma de decisiones clínicas. Una comprensión más profunda del vínculo entre el estrés del RE, la inflamación y la autofagia proporcionaría nuevas estrategias futuras para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardíacas.

13 BIOMARCADORES EN CARDIOLOGÍA

Las estrategias de tratamiento de ECVs como la enfermedad coronaria o las MCs como la MCD se centran en la prevención mediante el control de los factores de riesgo, el diagnóstico precoz y la estratificación de riesgo.

Los biomarcadores, en sentido amplio, son marcadores de un proceso o estado biológico. Se usan a menudo en estudios de investigación, pero también pueden ser útiles si informan sobre el estado actual o el riesgo futuro de enfermedad. El biomarcador ideal debe presentar unas características básicas tales como ser accesible mediante protocolos no invasivos, económico, ser exactos, precisos, presentar elevada sensibilidad y especificidad para la enfermedad de interés, adaptable desde un modelo celular o animal a humanos, y que proporcione una indicación temprana confiable de la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas clínicos.

En la actualidad, la mayoría de los biomarcadores con aplicación clínica en el área cardiovascular y específicamente en el campo de las MCs se basan en proteínas tales como las troponinas cardíacas [131], la familia de péptidos natriuréticos o el péptido natriurético de tipo N-terminal pro-B (NT-proBNP) [132] y la proteína C reactiva (PCR). Sin embargo, estos biomarcadores tradicionales no son específicos de una enfermedad sino de una situación patológica. Así, la troponina I (TnI) informa sobre lesión en los cardiomiocitos; bien por enfermedad coronaria, bien por un proceso infeccioso o inflamatorio. Su utilidad se ve comprometida por la heterogeneidad inter e intraindividual de las enfermedades, la comorbilidad, la genética y la proteómica específicas, así como por las características y el estilo de vida del paciente [133]. La Galectina-3 (Gal-3) es una lectina secretada por macrófagos activados que favorece el desarrollo de fibrosis cardíaca a través de la estimulación de fibroblastos y representa el vínculo entre inflamación y fibrosis. Gal-3 demostró tener un papel pronóstico en pacientes afectados por IC: cuantos más altos los niveles, más grave es la fibrosis cardíaca y la remodelación del VI. Sin embargo, Gal-3 no es un biomarcador específico del corazón y se expresa

abundantemente en muchos órganos y tejidos. Sus valores se ven influidos por condiciones comórbidas como diabetes y disfunción renal o hepática [134].

Los estudios genéticos han demostrado como algunos *loci* o genes están asociados al desarrollo de determinadas patologías cardíacas o bien determinan factores de riesgo de sufrirlas. Una diferencia clave al examinar los biomarcadores genéticos en comparación con biomarcadores de naturaleza proteica o de imágenes es que los marcadores genéticos están presentes desde el nacimiento y pueden identificarse antes del desarrollo de la enfermedad.

Dentro de los biomarcadores genéticos, tienen un interés especial los epigenéticos (metilación del ADN y el ADN no codificante -ncDNA-) ya que pueden empezar a identificarse en estadios muy tempranos de la patología, incluso antes de sus primeras manifestaciones clínicas. Además, puede usarse la información genética para guiar la terapia farmacológica en función de la presencia o ausencia de esos marcadores y su asociación con los resultados [135].

13.1 BASES GENÉTICAS DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

En los años 90 se describieron los primeros genes asociados a la MCD [136][137]. El avance tecnológico y las numerosas publicaciones científicas aparecidas desde entonces han ampliado la lista de genes asociados a la patología hasta aproximadamente más de 250 a día de hoy [138]. El descubrimiento de variantes genéticas en general se ha visto especialmente favorecido por la aparición de los equipos de secuenciación masiva de nueva generación (*Next Generation Sequencing* -NGS-) que a partir de la década de los 2000 supuso una revolución en relación a las técnicas de secuenciación tradicional ya que permiten la secuenciación de múltiples muestras de ácido desoxiribonucleico (*Desoxiribonucleic Acid* –DNA-) y múltiples regiones de ADN de manera simultánea. El principal reto de la NGS es el gran volumen de datos que genera y el nivel de requerimientos bioinformáticos que implica el filtrado de los datos obtenidos. Además se añade la dificultad de la interpretación de todas las variantes identificadas y la determinación del grado de patogenicidad de cada una de ellas.

La MCD se ha considerado clásicamente una enfermedad monogénica (Tabla 2) con un patrón de herencia autosómico dominante, siendo una única variante genética la causa de la enfermedad aunque otros factores ambientales, como por ejemplo la edad y el sexo, influyentes en su expresividad [139]. Los estudios familiares llevados a cabo en las últimas décadas han identificado otros patrones de herencia: autosómico recesivo, ligado a X y mitocondrial [140][141] aunque son casos poco frecuentes. Actualmente las variantes descritas asociadas a MCD se agrupan en genes codificantes de proteínas con funciones diversas (Figura 5); sarcoméricas, del citoesqueleto, de uniones intercelulares y de canales iónicos siendo la titina del sarcómero, y la proteína lámina A/C de la cubierta nuclear, las proteínas que concentran un mayor número de variantes patogénicas descritas [142][72].

Tabla 2. Principales genes asociados a la miocardiopatía dilatada.

GEN	LOCUS	PROTEÍNA	FRECUENCIA	ClínGEN CLASIFICACIÓN	PATRÓN DE HERENCIA
<i>ACTC1</i>	15q11q14	Actina Alfa del músculo cardíaco 1	<1%	Moderado	Autosómico dominante
<i>ACTN2</i>	1q43	Alfa-actinina 2	<1%	Moderado	Autosómico dominante
<i>BAG3</i>	10q26.11	Regulador 3 de la Familia BAG de Moléculas Chaperonas	~2%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>DES</i>	2q35	Desmina	<1%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>DSP</i>	6p24.3	Desmoplaquina	1-3%	Fuerte	Autosómico dominante o recesivo
<i>FLNC</i>	7q32.1	Filamina-C	~3%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>JPH2</i>	20q13.12	Junctofilina 2	<1%	Moderado	Autosómico semidominante
<i>LMNA</i>	1q22	Lamina A/A	~4-7%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>MYH7</i>	14q11.2	Cadena pesada de miosina 7	~3-5%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>NEXN</i>	1p31.1	Proteína de unión a F-actina Nexilin	<1%	Moderado	Autosómico dominante
<i>PLN</i>	6q22.31	Fosfolamban	~1%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>RBM20</i>	10q25.2	Proteína 20 con motivo de unión a RNA	~2%	Definitivo	Autosómico dominante

<i>SCN5A</i>	3p22.2	Subunidad alfa 5 del canal de sodio dependiente del voltaje	<1%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>TNNC1</i>	3p21.1	Troponina C1, tipo lento de esquelético y cardíaco	<1%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>TNNI3</i>	19q13.4	Troponina I3 cardíaca	<1%	Moderado	Autosómico dominante o recesivo
<i>TNNT2</i>	1q32.1	Troponina T2 cardíaca	~2%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>TPM1</i>	15q22.1	Tropomiosina 1	~1-2%	Moderado	Autosómico dominante
<i>TTN</i>	2q31.2	Titina	~15-25%	Definitivo	Autosómico dominante
<i>VCL</i>	10q22.2	Vinculina	<1%	Moderado	Autosómico dominante

13.1.1 PROTEÍNAS DEL SARCÓMERO CELULAR

Las proteínas sarcoméricas son esenciales para el movimiento de contracción y relajación de las miofibrillas cardíacas. Las variantes genéticas asociadas a los genes del sarcómero cardiomiocítico representan aproximadamente un 10% de los casos de MCD. Estas proteínas son mayoritariamente: titina, miosina, actina, troponina y tropomiosina.

El gen *ACTC1* codifica la α -actina cardíaca que, junto con las proteínas reguladoras tropomiosina y troponinas C, I y T, forma el filamento contráctil delgado, que a su vez conecta el disco Z miocelular con la proteína miosina del filamento grueso. Las variantes en *ACTC1* mayormente localizadas en los puntos de interacción entre actina y citoesqueleto (en la línea Z del sarcómero) interrumpen la transmisión de fuerza contráctil. Los ratones que carecen de *actc1* muestran letalidad embrionaria o perinatal y desorden miofibrilar. En la MCD humana, *ACTC1* fue el primer gen causal descrito para la IC de origen autosómica dominante [136]. Actualmente solo se han publicado unas pocas variantes (principalmente en el subdominio 3) y se carece de estudios funcionales que refuercen su función fisiológica [143].

La alfa-actinina-2, la proteína codificada por *ACTN2*, es un componente importante del disco Z del sarcómero expresado en el músculo cardíaco y esquelético, une filamentos de actina y estabiliza el movimiento de contracción. Además, la alfa-actinina-2 interactúa con varios sistemas de señalización, proteínas y canales iónicos. Alteraciones en la alfa-actinina-2 afecta la localización y función de los

canales iónicos cardíacos y consecuentemente podría contribuir a la aparición de fenotipos patogénicos.

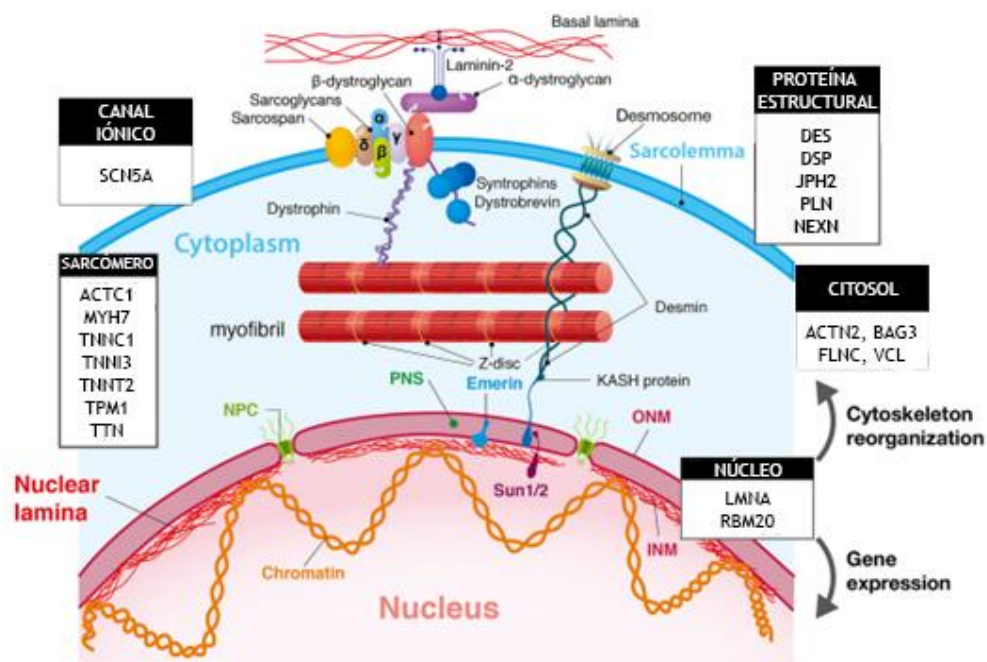


Figura 5. Principales genes asociados a la MCD y sus funciones celulares. Imagen adaptada de Kae Won Cho et al. 2016 [144].

El gen *MYH7* codifica la cadena pesada de β -miosina 7, un componente clave del sarcómero cardíaco. Las variantes relacionadas con MCD afectan la función contráctil del miocardio al alterar la formación de puentes cruzados miosina-actina responsables de la contracción de los miocitos. Las variantes patogénicas en *MYH7* se describen en 1% a 5,3% de los casos de MCD [145].

Las troponinas tienen una función reguladora en la contracción del músculo estriado. Este complejo proteico está formado por tres subunidades, la troponina I (TnI), la troponina T (TnT) y la troponina C (TnC) [146]. La troponina C cardíaca, codificada por el gen *TNNC1*, funciona como un sensor del ion calcio de miofilamento y desempeña un papel fundamental en la regulación de la contracción [147]. Variantes missense en el gen *TNNC1* han sido reportadas asociadas a la MCD e incluso estudios experimentales en modelos animales refuerzan la patogenicidad de variantes en este gen [148]. Por otro lado, las variantes asociadas a *TNNI3* no tienen todavía evidencias suficientemente fuertes como para establecer una correlación

genotipo-fenotipo consistente. Uno de los motivos es el grado de penetrancia de la enfermedad para la misma variante patogénica. El gen *TNNT2* transcribe para la proteína troponina T tipo 2 subunidad de unión del complejo troponina-tropomiosina. Regula la contracción en respuesta a la concentración de calcio intracelular. Se han descrito variantes en este gen con una elevada penetrancia [149].

En casos aislados también se han descrito variantes en el gen de la tropomiosina (*TPM1*) localizadas en la región del extremo C-terminal de la proteína. En pacientes pediátricos son mayoritariamente de tipo missense las relacionadas con MCD [150].

La titina, codificada por el gen *TTN*, es la proteína sarcomérica más larga del miocardio. En combinación con las proteínas actina y miosina es responsable de la estabilización e integridad estructural de todo el sarcómero. También está implicada en la transducción de señales de las miofibrillas a otros compartimentos de la célula muscular, incluyendo el núcleo. Las variantes genéticas que generan proteína titina truncada están relacionadas con el 25% de los casos más graves de MCD [151] [152]. Algunos estudios reportan una mayor concentración de variantes truncadas en *TTN* (*TTN tv*) en el dominio asociado a la banda A sarcomérica, aunque también se han publicado hallazgos en regiones a lo largo de todo el gen [153]. El efecto de las variantes truncadas variará en función del exón mutado y de la distancia de la variante al extremo N-terminal de la proteína [152]. Aun así, las variantes troncales de *TTN* se hallan con baja frecuencia (2-3%) en la población general lo que dificulta la determinación de la patogenicidad de estas variantes [154] y, en general, producen fenotipos relativamente leves. Por el contrario, las variantes de tipo missense son extremadamente frecuentes, se han descrito como benignas o de significado incierto [155].

13.1.2 PROTEÍNAS DE LA COBERTURA NUCLEAR

Las proteínas de la envoltura nuclear llamadas laminas son importantes para mantener las funciones celulares normales, incluida la replicación del ADN, la expresión génica, la organización de la cromatina, la regulación de la división celular, garantizar la estabilidad nuclear y la transducción de señales [156]. Alteraciones en el gen *LMNA* pueden causar una amplia variedad de MCS y muchas de ellas han sido asociadas a MCD aunque no existen correlaciones exclusivas entre genotipo y

fenotipo [157][158]. sí se ha demostrado una correlación entre la penetrancia y la edad siendo del 90%-95% a partir de los 70 años.

En relación al tipo de variantes descritas en el gen *LMNA*, [159] se ha descrito correlación entre las variantes de *splicing* y un mayor riesgo de MSC y entre las variantes de tipo *indel*, de truncamiento y de *splicing* con riesgo de sufrir arritmias ventriculares. También se ha reportado que las variantes en *LMNA* que dan lugar a proteínas truncadas junto a las variantes de tipo missense representan entre un 5 y un 8% de los casos de MCD y la penetrancia es cercana al 100% [160][161]. Después del gen *TTN*, la *LMNA* es el segundo gen con mayor porcentaje de variantes genéticas patogénicas que dan origen a una MCD. Para la MCD idiopática las variantes en *LMNA* explican entre el 5 % y el 13 % de los casos [162][163].

13.1.3 CANALES IÓNICOS

Los genes que codifican para los canales iónicos de los miocitos se reportan estrechamente vinculados a canalopatías aunque también tienen una relevancia en la MCD. El más frecuente es el gen que codifica por el canal de sodio cardíaco (*SCN5A*) o el gen que codifica para la proteína fosfolamban (*PLN*) localizada en la membrana del retículo sarcoplasmático. Por un lado, se conocen variantes patógenas o probablemente patógenas de *SCN5A* en casi el 2 % de los casos de MCD [164]. Se han informado casos esporádicos y formas familiares con herencia autosómica dominante [1654]. Las variantes asociadas con MCD se han localizado en los dominios citoplásmico, extracelular y transmembrana (DI-DIV) de NaV1.5. Los principales hallazgos que respaldan un papel potencial en la MCD son la agregación familiar del rasgo y la segregación de variantes de *SCN5A* con fenotipo clínico y/o características histológicas de la MCD, con o sin anomalías eléctricas asociadas (aunque con penetrancia reducida) [166].

Las variantes patogénicas en *PLN* causan MCD porque alteran la homeostasis del calcio dentro de los cardiomiocitos e interrumpen el ritmo de la contracción del miocardio, así pues, no influyen directamente en las características estructurales o funcionales de los cardiomiocitos [167].

13.1.4 PROTEÍNAS DESMOSOMALES

Los desmosomas mantienen la integridad mecánica y eléctrica del músculo cardíaco conectando miocitos adyacentes. La desmoplaquina (codificada por el gen *DSP*) es la proteína más abundante del desmosoma. Las variantes de los genes desmosómicos se identifican en un subconjunto de pacientes con MCD que tienen mayor riesgo de ECV y arritmias ventriculares potencialmente mortales, independientemente de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo [169][168]. La presencia de variantes en genes desmosomales (*DSP*, *DSC2*, *DSG2*, *PKP2*, *JUP*) se estima en alrededor de un 3% de los casos [170]. La caracterización de variantes desmosomales para MCD se ve dificultada por la elevada superposición de aspectos compartidos con la miocardiopatía aritmogénica.

13.1.5 OTRAS PROTEÍNAS

El gen *JPH2* codifica la proteína de unión a la membrana plasmática junctofilina-2 cardíaca. Tiene función estructural ya que garantiza el anclaje entre el retículo sarcoplasmático y la membrana plasmática. Pero también está implicada en la regulación de la liberación de calcio durante el proceso de acoplamiento excitación-contracción del miocardio [171] Variantes identificadas en este gen se han asociado a MCD [172]. La integridad estructural y mecánica, la orientación y contracción del sarcómero dependen del correcto funcionamiento de las proteínas citoesqueléticas y el disco Z. Los genes de la desmina (*DES*), distrofina (*DMD*), filamina C (*FLNC*) nexilina (*NEXN*), nebulina (*NEBL*), proteína 3 de unión al dominio LIM (*LDB3*) y vinculina (*VCL*) pertenecen al grupo de proteínas no motoras de unión a la actina dentro del disco Z.

La desmina es el componente principal de los filamentos intermedios específicos de las células musculares. Variantes patogénicas en el gen *DES* causan un espectro amplio de fenotipos y son responsables del 1-2% de los casos de MCD [173]. La distrofina tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X. Forma parte de un complejo glicoproteico que proporciona un encaje mecánico fuerte entre sarcolema y citoesqueleto intracelular. La filamina C es un filamento intermedio que contribuye al anclaje de las proteínas de la membrana celular al citoesqueleto para estabilizar al sarcómero y la región del disco Z. La vinculina está implicada en la conexión al citoesqueleto de actina de las moléculas de conexión integrinas. La proteína de

unión al dominio Lim interactúa con la alpha-actinina-2 y la proteína quinasa C manteniendo la estructura del disco Z durante la contracción de la célula muscular. Variantes patogénicas en genes que codifican para proteínas estructurales representan un 5% [170].

13.1.6 OTROS GENES ASOCIADOS A MCD

El gen regulador de la actividad chaperona de la familia de proteínas BAG (*BAG3*). Este gen codifica para una proteína con función apoptótica localizada en el disco Z. En base a las ubicación y tipo de variantes descritas en este gen se conoce la criticidad de cada región del gen. Por ejemplo, todas las variantes que dan lugar a una proteína truncada se han identificado antes del aminoácido 451, mientras que las variantes benignas de la región proteica PXXP reflejan una menor criticidad funcional de esa región de la proteína [174].

El gen *RBM20* codifica la proteína de unión a RNA que actúa como regulador del splicing del mRNA de un subconjunto de genes que codifican proteínas estructurales clave implicadas en el desarrollo cardíaco. Las variantes autosómicas dominantes en el gen *RBM20* representan entre el 2 y el 6% de los pacientes con MCD familiar [163][175]. Muchas de las variantes descritas se localizan en el exón 9 del gen, que codifica un dominio rico en arginina/serina (rico en RS) [175][176] y que contiene la señal de localización nuclear de *RBM20* [177]. Si bien la mayoría de las variantes patogénicas en el gen *RBM20*, en individuos con MCD, son alteraciones nonsense, también se han identificado algunas inframarcas, lo que sugiere que las variantes nonsense probablemente sean dañinas.

13.2 IMPORTANCIA DE LA RECLASIFICACIÓN DE VARIANTES

En 2015 las guías del Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (*American College of Medical Genetics -ACMG-*) definieron unos nuevos criterios para la valoración estandarizada de variantes. Se introdujo el término variante en lugar de las palabras mutación y polimorfismo. También se establecieron las categorías de patogénica (P), probablemente patogénica (LP), variante de significado incierto (VUS), probablemente benigna (LB) y benigna (B) para una variante [178]. Los distintos tipos de alteraciones (sinónimas, *splicing*, *nonsense*,

missense, deleciones, etc.) tendrán un grado de patogenicidad diferente según la afectación funcional que produzcan [179], pero además la categorización de una variante depende de evidencias reportadas basadas en la prevalencia de la variante, la asociaciones entre variante y enfermedad, datos predictivos funcionales y computacionales, y similitud entre los datos del paciente, características clínicas y aquellas asociadas con la alteración del gen en el que se encuentra una variante.

Cuando una variante genética queda clasificada como de significado incierto (*Variant of Unknown Significance* –VUS-) significa que en el momento de la clasificación no existían suficientes evidencias para afirmar con rotundidad que la variante está relacionada con la patología [178]. Puede tratarse de una variante rara pero no haberse identificado en individuos afectados o bien, el efecto de esa variante utiliza un mecanismo desconocido para el gen en cuestión. Si la variante se ha informado en personas afectadas por la enfermedad, pero también se observa en una gran cantidad de individuos control, a menudo es difícil determinar si esto representa una penetrancia reducida de la variante o si la variante es común.

Las variantes VUS añaden una dificultad notable a la práctica clínica puesto que no pueden usarse para la toma de decisiones sobre el paciente. Según la ACMG a falta de variantes P o LP, las decisiones clínicas deben tomarse usando los antecedentes del paciente y familiares. Además habrá que mantener al paciente bajo seguimiento clínico para poder reunir evidencias suficientes que permitan una reclasificación de la variante [180]. Por ejemplo, pueden aparecer nuevos pacientes con esa misma variante y fenotipo, o bien, el estudio genético de familiares a riesgo, y con ello la segregación, puede aportar nuevas pruebas que apoyen un cambio en la clasificación.

Por último, los continuos proyectos de secuenciación masiva de cohortes sanas de poblaciones étnicas o geográficas no analizadas previamente, los estudios funcionales de variantes o la identificación de variantes adicionales del mismo tipo pueden respaldar la reclasificación. Por ello es altamente recomendable establecer un periodo de re-evaluación de variantes VUS puesto que recientemente se están reportando estudios donde se demuestra cómo estas variantes cambian de categoría debido a la aparición de nuevas evidencias o estudios que refuerzan la patogenicidad o benignidad de tales variantes [180]. Ya en 2018 Mersch et al.

demostraron tal necesidad cuando un 7.7% de las variantes de significado incierto de su cohorte oncológica fueron reclasificadas [181]. Más recientemente, Vallverdú-Prats y col. [182] Sarquella-Brugada y col. [183] y Campuzano O y col. [184] evidenciaron que en MC arritmogénica y en canalopatías el porcentaje de reclasificación se encuentra entre el 10-70%, dependiendo de la patología así como el año de la primera clasificación. Lo que se estipula es que las variantes clasificadas antes de 2015 (es decir, sin seguir las guías ACMG) deben ser reclasificadas inmediatamente ya que los porcentajes de variación son muy elevados. En las variantes reclasificadas siguiendo los criterios ACMG, entre 2-5 años se ha identificado el periodo más adecuado viendo que las previamente clasificadas como P-LP o bien B/LB no suelen ser modificadas (menos del 1%). En cambio, las que estaban clasificadas como VUS, tiene porcentajes muy elevados de modificación, sobre todo debido al aumento de estudios focalizados en las frecuencias poblacionales que permiten, en base de la prevalencia de una patología, establecer valores de MAF (Minor Allele Frequency) concretos para cada patología.

Aunque la lista de genes reportados en relación a MCD es de un centenar con la creación por parte de ClinGen de los estándares de clasificación de validez clínica la lista de genes asociados a MCD como causa única de la patología quedó limitada a 51 genes. Clasificados como definitivos (existen evidencias irrefutables de su correlación con la patología) fueron 11: *BAG3*, *DES*, *FLNC*, *LMNA*, *MYH7*, *PLN*, *RBM20*, *SCN5A*, *TNNC1*, *TNNT2*, *TTN*. El gen desmosomal *DSP* quedó incluido como fuertemente relacionado. Para definir este grupo se considera evidencia suficiente bibliografía independiente basada en datos experimentales para demostrar la vinculación del gen a la patología. Clasificados con un nivel moderado se incluyeron 7 genes: *ACTC1*, *ACTN2*, *JPH2*, *NEXN*, *TNNI3*, *TPM1* y *VCL*. Quedaron incluidos en esta categoría aquellos genes que están soportados por un 50% de evidencias experimentales y teóricas. Otros 25 genes quedaron incluidos en una categoría con bajo soporte de evidencias porque no se puede demostrar aún una correlación exclusiva con la MCD, cuatro (*MYL3*, *PDLIM3*, *PKP2*, *PSEN1*) se agruparon en la categoría “en disputa” porque las evidencias reportadas son insuficientes y no puede descartarse un origen no monogénico de la patología, dos, *NPPA* y *MIB1*, no demuestran relación con la enfermedad y uno (*LRRC10*) está únicamente defendido por un modelo animal.

Después de un estudio genético la identificación de variantes patogénicas o benignas puede ser muy útil para el especialista para la toma de decisiones clínicas [185]. No sucede lo mismo con las variantes de significado incierto puesto que la toma de decisiones puede no ser precisa. Por ello se justifica un reanálisis periódica de las variantes raras clasificadas como VUS porque esto puede tener consecuencias vitales para los pacientes y sus familiares [182][186][187][188][189]. Un cambio significativo en la clasificación de una variante, debe ser trasladado a los especialistas cardiólogos para que ellos informen rápidamente a los pacientes interesados y, si es necesario, modificar su intervención terapéutica.

14 EL RNA NO CODIFICANTE

La mayoría de los RNA no codificantes (ncRNA) descritos se han asociado a funciones relativamente genéricas en las células, como los RNA ribosómicos (rRNA) y los RNA de transferencia (tRNA) implicados en la traducción del RNA mensajero (mRNA), los pequeños RNA nucleares (snRNA) responsables del proceso de *splicing* del RNA y los pequeños RNA nucleolares (snoRNA) involucrados en la modificación del rRNA. Está aceptado que la mayor parte de la información genética que da lugar al organismo y su fenotipo se expresa en forma de proteínas, que no sólo cumplen diversas funciones catalíticas y estructurales, sino que también regulan la actividad fisiológica de diversas maneras. Paralelamente, las secuencias que no codifican proteínas o elementos reguladores que actúan *en cis*, es decir, la mayor parte de secuencias intrónicas e intergénicas, se han considerado elementos prescindibles acumulados a lo largo de la evolución de la especie como consecuencia de la unión de regiones del genoma y /o la inserción de elementos genéticos móviles. Ahora sabemos que buena parte de estas secuencias aparentemente sin función se transcriben. También existen cada vez más evidencias que el RNA tiene múltiples funciones biológicas [190], en particular, la regulación genética [191] tanto *en cis* como *en trans*, especialmente en los eucariotas superiores.

14.1 ncRNA: CLASIFICACIÓN.

Los ncRNA se pueden dividir en diferentes clases según su tamaño. Algunas de las categorías comunes de ncRNA basadas en su longitud incluyen:

- I. lncRNA (RNA no codificante largo): Los lncRNAs son ncRNAs largos que generalmente tienen una longitud mayor de 200 nucleótidos. Estas moléculas de RNA cumplen una amplia variedad de funciones en la célula tales como la regulación de la expresión génica, la organización de la cromatina y la señalización celular. Dentro de este grupo se circunscriben los circRNAs. Los circRNAs presentan una estructura circular con los extremos 3' y 5' unidos covalentemente [192]. Los circRNA son capaces de reconocer y unirse a los miRNAs actuando como esponjas de éstos (*sponge*), por lo que están

implicados directa o indirectamente en la expresión génica de las células [193].

- II. microRNAs (miRNAs): Los miRNAs son ncRNAs cortos que consisten en aproximadamente 20-22 nucleótidos. Su función principal es regular la expresión génica post-transcripcionalmente al unirse a mRNA específicos y suprimir la traducción o inducir su degradación.
- III. RNA de interferencia (siRNA): Son ncRNAs cortos similar a los miRNAs. Se utilizan en procesos de interferencia de RNA para silenciar genes específicos. Los siRNAs se usan experimentalmente en las células para regular la expresión génica.
- IV. *piwi-interacting* RNA (piRNA): Los piRNAs son ncRNAs de aproximadamente 24-30 nucleótidos de longitud y están involucrados en la regulación de elementos genéticos móviles, como transposones, en las células germinales.
- V. RNA nucleolar pequeño (snoRNA): Los snoRNAs son ncRNAs cortos, generalmente de alrededor de 60-300 nucleótidos, que se encuentran en el nucleolo y están involucrados en la modificación de rRNA y tRNA.
- VI. RNA nuclear pequeño (snRNA): Los snRNAs son ncRNAs cortos que se encuentran en el núcleo celular y desempeñan un papel en la maquinaria de procesamiento del RNA, incluyendo el *splicing*. Los snRNAs son generalmente de alrededor de 150-300 nucleótidos de longitud.
- VII. RNA ribosómico (rRNA): Los rRNAs son extremadamente largos, pueden tener miles de nucleótidos de longitud. Componen la mayor parte del RNA celular y son fundamentales para la estructura y función de los ribosomas.
- VIII. RNA de transferencia (tRNA): Los tRNAs son ncRNAs que transportan aminoácidos a los ribosomas durante la síntesis de proteínas. Tienen una estructura característica de "trébol" y generalmente consisten en alrededor de 70-90 nucleótidos.

La regulación de la expresión génica por ncRNA se lleva a cabo a través de sus interacciones con otras moléculas, incluyendo ADN, RNA y proteínas. Los ncRNAs pueden funcionar como reguladores positivos o negativos de la expresión génica y desempeñar un papel importante en la modulación de diversos procesos biológicos. Por ejemplo, los ncRNA como el iRNA (RNA de interferencia), es decir los siRNA, miRNA y piRNA [194], pueden unirse al ADN y guiar complejos proteicos hacia

genes específicos, donde inducen la metilación del ADN o modifican la estructura de la cromatina contribuyendo a la reorganización de esta alterando la accesibilidad al ADN para la maquinaria de transcripción, fenómeno que conduce al silenciamiento génico. Los siRNA y el RNA antisentido (asRNA), secuencias de ADN complementarias a los mRNA, pueden unirse a mRNAs específicos y guiar la maquinaria de degradación para destruir selectivamente moléculas de mRNA evitando la traducción de proteínas. Algunos ncRNA participan en el transporte de RNA desde el núcleo hasta el citoplasma, lo que afecta a la disponibilidad de mRNA para la traducción.

14.2 ncRNA: CARACTERÍSTICAS COMO BIOMARCADORES

El estudio del conjunto de los ncRNAs presentes en una célula constituye una de las estrategias en el desarrollo de nuevos biomarcadores que podría brindar información sobre los estados fisiológicos y patológicos de un individuo [195]. De hecho, los biomarcadores transcriptómicos pueden proporcionar una caracterización profunda de los fenotipos de la enfermedad y podrían ofrecer información que los marcadores tradicionales o las características clínicas no captan.

La expresión de los ncRNAs exhibe grandes variaciones entre células, es altamente dinámica y se altera rápidamente en respuesta a factores estresantes. De hecho, se ha demostrado una estrecha correlación entre la desregulación del perfil de los ncRNAs y la fisiopatología de numerosas afecciones cardiovasculares [196]. Además, las alteraciones de los ncRNAs podrían orientar hacia una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales. La dieta, el ejercicio, los ritmos biológicos u otros factores exógenos que no se consideran de forma rutinaria durante la evaluación clínica influyen en la expresión de ncRNAs [198][199]. Por lo tanto, el transcriptoma no codificante brinda una oportunidad interesante para la identificación de nuevas herramientas para ayudar en la toma de decisiones clínicas. Por sus características son potencialmente biomarcadores de fácil acceso y mínimamente invasivos, la presencia de ncRNAs se ha descrito ampliamente en una gran cantidad de fluidos corporales [200][201]. Desde una perspectiva clínica, el transcriptoma no codificante tiene las propiedades bioquímicas óptimas para ser excelentes biomarcadores ya que son fácilmente cuantificables con alta sensibilidad

y especificidad. Finalmente, los ncRNAs son estables frente a condiciones adversas como ebullición, pH extremo, almacenamiento a temperatura ambiente o ciclos de congelación y descongelación y tienen una vida media prolongada en muestras biológicas [202].

Los avances en la comprensión de cómo funcionan las ECVs, incluyendo la importancia de ciertos tipos ncRNAs, junto con los desarrollos tecnológicos actuales, están permitiendo la creación de un tipo novedoso de tratamientos basados en pequeños ncRNA [203]. Otros tipos de moléculas como las esponjas de miRNAs, lncRNAs y circRNAs, que son de mayor longitud o RNA Guía de Sistemas CRISPR-Cas utilizados para la edición genética están en fases menos avanzadas de desarrollo clínico. Así, se han introducido en contextos clínicos diversas terapias basadas en ncRNAs para tratar la hiperlipidemia [204]. Esta innovación presenta la posible ventaja de aumentar la adherencia del paciente gracias a un programa de dosificación menos frecuente, y muestra una mayor eficacia, ya sea aplicada como tratamiento único o en combinación con otros enfoques terapéuticos. A día de hoy, otros muchos ncRNAs están en la etapa de estudios clínicos para diferentes aplicaciones en ECVs. El siRNA, Inclisiran, reconoce PCSK9, estimulando positivamente los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLc) en los hepatocitos, lo que resulta en una disminución consiguiente de los niveles de LDLc en la sangre [205]. Los estudios ORION [206] que son ensayos clínicos aleatorizados controlados con placebo, han demostrado su eficacia en pacientes con hipercolesterolemia familiar, ECVs o aquellos con alto riesgo de ECVs. Estos estudios han evidenciado una reducción sustancial en los niveles de LDLc (~50%), así como en el colesterol total y lipoproteína (a) [Lp (a)].

14.3 LOS MICRORNAs

El primer microRNA (miRNA), lin-4, fue descrito en 1993 en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [207][208]. Desde entonces, se han identificado miRNAs en todos los sistemas de modelos animales y se ha demostrado que algunos están altamente conservados en todas las especies [209][210][211]. Todavía se están descubriendo nuevos miRNAs [212] y sus funciones en la regulación genética son bien reconocidas.

Los miRNAs son pequeños ncRNAs que ejercen su función al interactuar con la región UTR 3' de los mRNAs. Ello genera la supresión de la expresión génica a nivel post-transcripcional [213]. Asimismo, se ha observado que los miRNAs pueden ejercer su función con otras regiones, incluidas la 5' UTR, la secuencia codificante y los promotores de genes [214][215]. La unión de los miRNAs a las regiones 5' UTR y codificantes tiene efectos de silenciamiento sobre la expresión [215][216], mientras que la interacción de los miRNA con la región promotora induce la transcripción [218][219][220]. También se ha descrito una interacción directa con otros ncRNAs y RNA viral. Un miRNA puede interactuar con cientos de mRNAs distintos y un mRNA particular puede ser regulado por múltiples miRNAs. Se ha demostrado que, en ciertas condiciones, los miRNAs pueden activar la expresión genética [221].

Investigaciones recientes indican que los miRNAs pueden ser transportados entre distintos compartimentos subcelulares para regular tanto la velocidad de traducción como la transcripción [222]. Los miRNAs no solo se encuentran en el interior de las células. También se han identificado en el espacio extracelular y en el tejido sanguíneo [223]. Los miRNAs extracelulares intervienen en la comunicación entre células están implicados en respuestas fisiológicas y en el inicio de enfermedades cardiovasculares [224].

14.4 BIOGÉNESIS DE LOS miRNAs.

El proceso por el cual los miRNAs se sintetizan y maduran se lleva a cabo en diferentes etapas (Figura 6). En primer lugar, se transcribe el gen que codifica para el precursor del miRNA que recibe el nombre de pre-miRNA. Gracias a la actividad de una RNA polimerasa de tipo II se sintetiza un transcrito primario (pri-miRNA) que puede ser de varios cientos de nucleótidos de longitud. Esta molécula es procesada en el núcleo celular por una RNasa III llamada Drosha [225] y su cofactor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*). Ambas enzimas cortan al pri-miRNA liberando una estructura secundaria en forma de horquilla, un precursor de miRNA (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos [226].

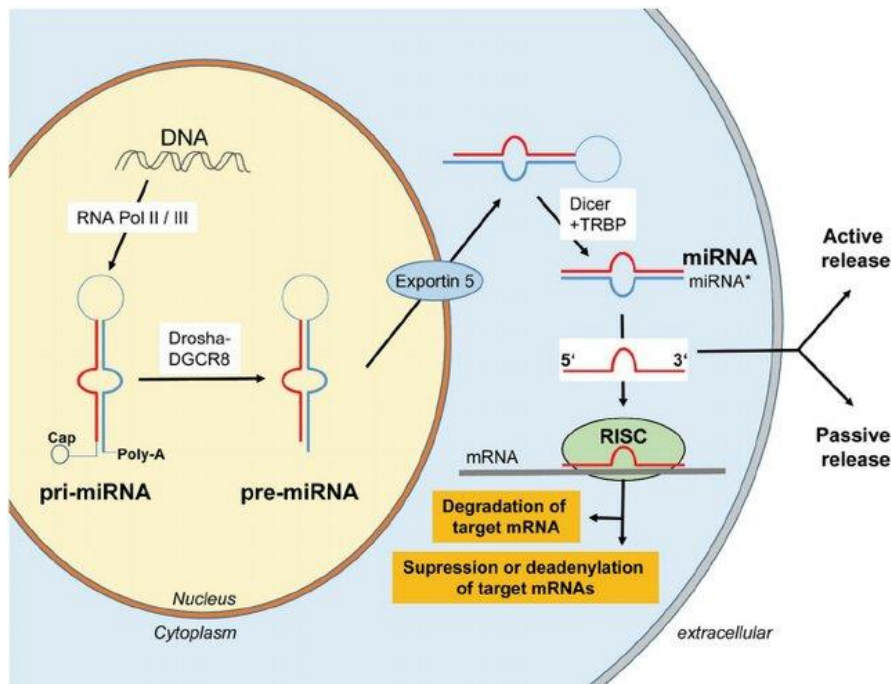


Figura 6. Esquema de la biogénesis de los miRNAs. Imagen tomada de Benz et al. 2016 [227].

El pre-miRNA es transportado desde el núcleo al citoplasma por la proteína RNA exportina-5. Allí una enzima RNasa III llamada Dicer [228] corta el pre-miRNA en un fragmento de RNA bicatenario de entre 20-22 nucleótidos que recibe el nombre de miRNA maduro [229]. Este miRNA se asocia a una proteína llamada Argonauta (Ago) para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC [230]. Este complejo guía el miRNA a las secuencias de mRNA específicas con las que se empareja de manera complementaria. Esta unión puede dar lugar a la degradación del mRNA o a la represión de su traducción. Ambas acciones conducirán a una reducción de la expresión génica y por tanto de la síntesis de la proteína.

Existen rutas alternativas a la vía canónica de biogénesis de los miRNAs mencionada anteriormente (Figura 7). Estas vías contribuyen a la diversidad y flexibilidad de la regulación génica por parte de los miRNAs y pueden ocurrir en condiciones muy específicas. En ocasiones, los precursores de los miRNAs, los primRNA, pueden ser procesados en el citoplasma sin acción de la Drosha en el núcleo celular. La enzima Dicer o una proteína relacionada llamada Drosha homóloga (DROSHA2) puede cortar el pri-miRNA en el citoplasma convirtiéndolo en pre-miRNA. Otras moléculas como los smiRNA pequeños pueden generarse por

procesos de corte independientes de Dicer. Por ejemplo, los tRNA pueden ser procesados para dar lugar a miRNAs pequeños llamados tRNA derivados de miRNA (tiRNAs). Los lncRNAs pueden dar lugar a miRNAs a través de un procesamiento no canónico. Así los lncRNAs pueden ser procesados por Dicer para generar miRNAs.

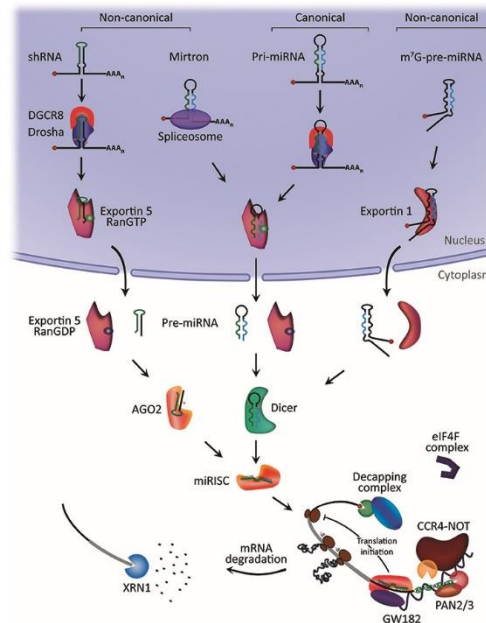


Figura 7. Rutas de biogénesis de los miRNAs alternativas a la canónica. Imagen tomada de *O'Brien et al. 2018* [231].

Los miRNAs maduros se unen a sus mRNAs diana mediante la unión de 2 a 8 nucleótidos de bases complementarias, en una región crítica conocida como secuencia semilla [232]. Estas secuencias semilla compartidas permiten agrupar los miRNAs en familias (Figura 8). La regulación genética que ejercen los miRNAs depende del grado de complementariedad entre estas secuencias semilla de los miRNAs y las secuencias en los mRNAs diana [233]. Cuando la complementariedad es parcial se reprime la traducción; por otro lado, si la complementariedad es completa, el mRNA diana experimenta degradación a través de la actividad endonucleasa de las proteínas Ago2 [234].

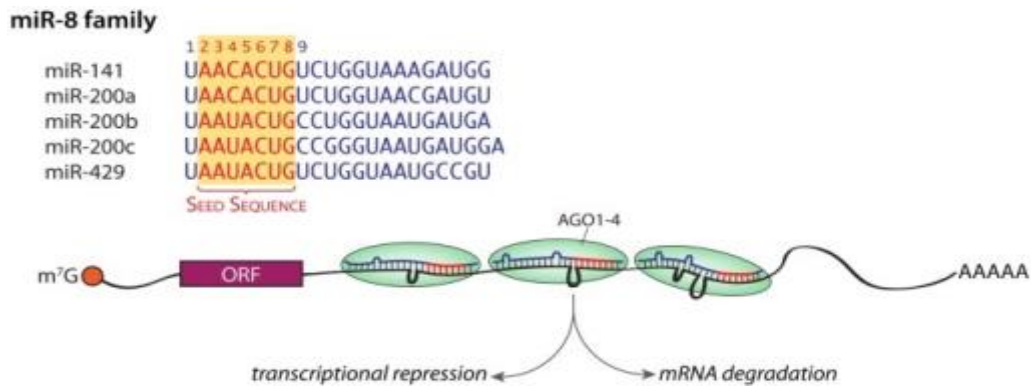


Figura 8. Familias de miRNA. Se muestran las secuencias de los cinco miembros de la familia miR-8; las secuencias de semillas compartidas se muestran en rojo. Se muestra un mRNA con RISC unido a tres loci diferentes en su 3'-UTR; el efecto neto de estas interacciones puede ser una disminución de la traducción o la degradación del RNAm. m⁷G, 7-metilguanósina en la tapa 5'; bola naranja, complejo de unión de cápsulas; ORF, marco de lectura abierto; AAAAA, cola poli A. Las discrepancias se muestran como bucles. Imagen tomada de *Eipper-Mains.2012* [235].

14.5 LOS miRNAs EN CARDIOLOGÍA COMO BIOMARCADORES

Se han descrito miRNAs involucrados en casi todos los procesos biológicos; proliferación celular, desarrollo, diferenciación, metabolismo, inmunidad, inflamación, apoptosis, autofagia, respuesta al estrés y control del ciclo celular. Una desregulación de los miRNAs está asociada a distintas patologías en el ser humano [236][237] incluidas las cardiovasculares [238]. Una disfunción de la endonucleasa Dicer (esencial en la biogénesis de los miRNAs) en progenitores cardíacos se asocia con un miocardio ventricular poco desarrollado y letalidad embrionaria [239], la ausencia de Dicer en el corazón da lugar a IC, letalidad postnatal y MCD [240].

Los perfiles de miRNAs en miocardio son tejido dependientes y están alterados en las enfermedades cardíacas. Actualmente, se ha descrito un número considerable de miRNAs implicados en la desregulación de diferentes procesos celulares en células cardíacas como cardiomiocitos, fibroblastos y células endoteliales [241]. Por ejemplo, los miembros de la familia del miR-1 y los miembros de la familia de miR-133 son los más abundantes en los miocitos cardíacos [242] y se transcriben a partir de la misma transcripción de pre-miRNA. El miR-1 representa aproximadamente el 40% de los miRNAs del corazón. Son muy abundantes al inicio del desarrollo cardíaco y promueven cooperativamente la diferenciación de células madre

embrionarias en células mesodérmicas. Sin embargo, en las siguientes etapas del desarrollo del corazón tienden a mostrar aspectos contrarios, inhibiendo la diferenciación de células madre embrionarias en cardiomiocitos.

Otro ejemplo es el miR-128a el cual está sobreexpresado en el músculo esquelético y aumenta durante la diferenciación de mioblastos [196]. Su sobreexpresión reprime la proliferación celular al dirigirse al sustrato 1 del receptor de insulina en mioblastos, mientras que, a nivel cardíaco, la represión de este miRNA promueve el desarrollo de cardiomiocitos. También se ha demostrado que miembros de la familia miR-15 y miR-16 reprimen la proliferación de cardiomiocitos al inhibir múltiples reguladores del ciclo celular e inducen la apoptosis inhibiendo el factor anti-apoptótico Bcl2 [243].

Entre sus ventajas biológicas como biomarcadores, como otros ncRNAs, los miRNAs circulantes tienen un tiempo de vida media largo, pueden obtenerse mediante técnicas poco invasivas (suero y plasma) y pueden cuantificarse por qPCR. Estas características son las que los convierten en un biomarcador de interés clínico. Así, en 2012 fue aprobado en Estados Unidos de América un *kit* de detección de los niveles de expresión del gen PCA3 debido a su elevada especificidad en cáncer de próstata. En el caso concreto de cardiopatías también son conocidas alteraciones de los perfiles de expresión de determinados miRNAs [244][245][246]. Por lo tanto, los niveles circulantes de estos ncRNAs pueden ser indicadores clínicos para el diagnóstico y pronóstico de la [247][248][249].

Un gran número de estudios proponen el uso de miRNAs circulantes como potentes biomarcadores de aterosclerosis [250], síndrome coronario agudo [251], miocarditis [252], MCD [253][254][255] o IC [256]. Roncarati y colaboradores analizaron 21 miRNA directamente implicados en la angiogénesis, la fibrosis, la apoptosis, la hipertrofia y la biología de las células del músculo liso e identificaron 12 miRNA de distintas familias sobreexpresados en pacientes de cardiomiopatía hipertrófica. Además correlacionaron miR-27a, miR-199a-5p y miR-29a con la hipertrofia cardíaca. Este último también se correlaciona con la fibrosis cardíaca [257]. Un estudio realizado por Sommariva y colegas encontró que los niveles de miR-320a son más bajos en pacientes con miocardiopatía arritmogénica (MCA) en comparación con aquellos que tienen taquicardia ventricular idiopática (TVI), así como con pacientes sanos. Sugieren que miR-320a podría ser útil como un

marcador biológico para diferenciar entre estos dos trastornos cardíacos. Además, observaron que la expresión de miR-320a no parece cambiar debido a la remodelación o alteraciones del corazón causadas por el ejercicio físico, que es un factor de riesgo conocido para la MCA [258]. Toro y colaboradores identificaron a let-7a-5p, miR-142-3p, miR-145-5p y miR-454-3p como biomarcadores sobreexpresados en pacientes con MCD familiar portadores de variantes patogénicas en el gen *LMNA* [259].

En relación con el control de factores de riesgo cardiovascular, un estudio en pacientes hiperlipémicos tratados con estatinas demostró su influencia sobre la expresión de un conjunto de miRNAs en células sanguíneas [260]. Otras investigaciones demostraron que los niveles séricos de determinados miRNAs están elevados en pacientes hiperlipidémicos, lo que podría explicar su disminución en pacientes tratados con estatinas [261]. En el caso de pacientes con molestias musculares relacionados con el tratamiento con estatinas también se han propuesto miRNAs circulantes como biomarcadores del daño muscular producido y con modelos animales se demostró que miR-133a-3p/b, son marcadores específicos de toxicidad muscular [262]. Se han propuesto tres miRNAs circulantes (miR-133a/b y miR-499-5p) [262] como potenciales biomarcadores del daño muscular producido por la combinación del ejercicio y el tratamiento a estatinas. Hasta la fecha, no se publicado investigaciones en relación con la potencialidad de los miRNAs para identificar a individuos IE. La posibilidad de utilizar perfiles de miRNAs como biomarcadores para evaluar la respuesta al tratamiento con estatinas y prever posibles efectos adversos se erige como una alternativa real que ayude al diagnóstico de los pacientes que no toleran estatinas.

14.5.1 miRNAs REGULADORES DE PROCESOS BIOLÓGICOS CELULARES EN CARDIOLOGÍA

Los miRNAs son reguladores de numerosas funciones celulares y se han utilizado para entender los mecanismos fisiopatológicos en numerosas enfermedades cardiovasculares [263][264]. Diversos procesos como la respuesta inflamatoria, el estrés en el RE, la alteración de la función mitocondrial, el estrés oxidativo, la autofagia, la apoptosis y la formación de tejido fibroso se han identificado como elementos clave en la progresión de la disfunción del VI, el remodelado y, en última

instancia, en la formación de la IC asociada a la MCD [265][266]. Por lo tanto, resulta fundamental comprender las vías de señalización que regulan estos procesos y su impacto en cada causa de la MCD para diseñar enfoques terapéuticos específicos contra esta condición.

Los miRNAs controlan aproximadamente el 30% de todos los genes humanos que codifican proteínas, desempeñando una función crucial en la regulación de procesos biológicos mediante la formación de complejas redes que involucran múltiples interacciones entre miRNAs y mRNAs [267][268]. Se han descubierto más de 2,500 miRNAs en la especie humana [269], y se estima que aproximadamente un tercio del genoma humano está bajo la regulación de estos [270]. A pesar de ello, la función de muchos miRNAs aún permanece desconocida. La alteración en la regulación de los miRNAs se ha vinculado con prácticamente todas las enfermedades humanas, incluyendo aquellas de naturaleza cardiovascular [271].

Existen numerosos estudios en modelo animal en los que se demuestra las distintas funciones relevantes de los miRNAs a nivel fisiopatológico en la MCD. Corsten y colaboradores identificaron al grupo miR-221/-222 implicados en la respuesta inmune antiviral e inflamatoria en la miocarditis de origen vírica la cual está estrechamente relacionada con la [272]. Estos miRNAs están regulados positivamente en el tejido cardíaco de ratones durante la miocarditis vírica. En humanos, se encontró que miR-155 y miR-133a estaban regulados positivamente en biopsias endomiocárdicas de pacientes con MCD inflamatoria, en comparación con MCD no inflamatoria. Además, sus niveles de expresión se correlacionaron con el recuento de células inflamatorias en la cohorte de MCD inflamatoria [273] revelando un patrón distinto de expresión de miRNAs en células T CD4+ de pacientes con MCD en comparación con los controles, lo que sugiere un papel de los miRNA en la activación aberrante de las células T CD4+. Rao y colaboradores afirmaron que los miRNAs son críticos para el mantenimiento de la función cardíaca en cardiomiocitos maduros [274], más recientemente se ha descrito que el miR-16-5p está específicamente asociado con ICM donde activa el estrés del RE y promueve la inflamación [263].

Tanto los miRNAs como los componentes de la vía de estrés en el RE pueden influenciarse mutuamente en el contexto de la ECVs [275][276]. Sin embargo, se

sabe poco sobre el papel regulador de los miRNAs que modulan el estrés del RE durante la MCD de diferente etiología. Se ha demostrado que la inhibición de miR-194-5p atenúa la cardiotoxicidad de la doxorubicina relacionada con el estrés del RE en células H9c2 [277]. Se ha informado que PAK2 desempeña un papel cardioprotector al mejorar la función del RE a través de la vía IRE1/XBP1 [278] y dos estudios complementarios realizados por nuestro grupo encontraron que miR-16-5p estaba sobreexpresado en plasma de pacientes con ICM en comparación con controles sanos [263][279].

Se ha demostrado que la obesidad afecta la producción de factores no cardíacos, como adipocinas y miRNAs, que pueden tener un impacto en la función cardíaca mediante la modulación de la función mitocondrial [280][281]. Varios estudios han destacado el papel fundamental de los miRNAs en la regulación de la función cardíaca y la actividad mitocondrial en la MC relacionada con la obesidad. Los exosomas de ratones obesos aumentaron la expresión de miR-194 en cardiomiocitos primarios [282]; existen evidencias de que el entrenamiento físico podría controlar la expresión de miRNAs que están relacionados con las lesiones tisulares generadas por la obesidad. [283]. Además, se verificó que el sobrepeso y la obesidad afectan negativamente a ciertos miRNAs relacionados con la inflamación en la circulación, lo que contribuye al estado inflamatorio asociado con estas condiciones [284].

En relación con el rol de los miRNAs y los mecanismos moleculares que subyacen en las ECVs, destacan varios trabajos en relación con las hiperlipemias como principal factor de riesgo cardiovascular y su tratamiento principal, las estatinas. Un estudio piloto en pacientes hiperlipémicos tratados durante un mes con diferentes estatinas (atorvastatina o simvastatina) demostró su influencia sobre la expresión de un conjunto de miRNAs en las células mononucleares de sangre periférica [260]. En los pacientes tratados con atorvastatina se evidenciaba una disminución de los niveles plasmáticos de seis miRNAs (miR-29a-3p, -29b-3p, -300, -33a-5p, -33b-5p y -454), en cambio, en pacientes tratados con simvastatina aumentaba los niveles de tres miRNAs (miR-106b-5p, -17-3p y -183-5p). Muchos de estos miRNAs se ha comprobado que regulan genes claves en el metabolismo del colesterol como HMG-CoAR, LDLR, ABCA1, INSIGN1, LPL, SCAP y SREBF1 [285][286][287].

Precisamente, miR-29a/b, son dos miRNA asociados con la modulación de la LDL oxidada y las ECVs [260]. Estudios previos han demostrado que los niveles séricos de miR-33a/b están elevados en pacientes hiperlipémicos, lo que podría explicar su disminución en los pacientes tratados con estatinas [261]. En este sentido, se ha relacionado un perfil lipídico menos aterogénico con los niveles circulantes del miR-21 en pacientes con síndrome coronario agudo [288]. Los niveles de expresión del miR-206 se ven aumentados con la progresión de la esclerosis lateral amiotrófica, tanto en plasma como en músculo esquelético en un modelo de ratón que expresa la superóxido dismutasa-1 humana mutada [289]. Los niveles del miR-133a/b se correlacionan con toxicidad muscular en ratas tratadas con una dosis única de tóxicos de músculo cardíaco y esquelético [262].

15 HIPÓTESIS

Las enfermedades cardíacas, con la enfermedad cardiovascular ateromatosa principalmente, se erigen como la causa más importante de mortalidad en los países desarrollados a nivel mundial. A día de hoy continúan existiendo debilidades importantes en el manejo clínico de estas entidades nosológicas que conducen a un escenario devastador. Los avances en el conocimiento etiológico, fisiopatológico, pronóstico y terapéutico relacionados con estas enfermedades amortiguan su morbimortalidad, principalmente en las de etiología ateromatosa desde la utilización de las estatinas.

Por todo ello, hipotetizamos que los microRNAs pueden ser biomarcadores, para el abordaje de pacientes con intolerancia a las estatinas en una aproximación personalizada bien sean utilizados de forma aislada o con diferentes parámetros clínicos. Adicionalmente, la miocardiopatía dilatada es una patología responsable de gran parte de las muertes súbitas pese a que no se conocen todavía las bases patofisiológicas que permitan una identificación precoz. Hipotetizamos la importancia de los microRNAs en el reconocimiento de su etiología, su papel en la fisiopatología y su condición de potenciales dianas terapéuticas.

Finalmente, obtener un diagnóstico genético es clave para saber la causa de la patología, pero también para una identificación precoz de portadores del defecto genético que, por tanto, están a riesgo de padecer la patología. En el caso de la cardiomiopatía dilatada, los familiares portadores del defecto genético quedan sin una causa concluyente si el diagnóstico genético es ambiguo. Hipotetizamos que reanalizar estas variantes genéticas ambiguas permitirá clarificar su rol con el paso del tiempo, permitiendo obtener un diagnóstico genético concluyente, realizar un diagnóstico precoz y así adoptar medidas preventivas de forma personalizada.

16 OBJETIVOS

General:

Determinar la validez de nuevos biomarcadores en el manejo clínico de pacientes con enfermedad cardiovascular ateromatosa y con miocardiopatía dilatada de diferente etiología.

Específicos:

1. Evaluar la expresión diferencial de microRNAs circulantes en pacientes con elevado y muy elevado riesgo cardiovascular con intolerantes a estatinas.
2. Evaluar el potencial diagnóstico de los microRNAs sobreexpresados en pacientes intolerantes a estatinas para discriminar entre pacientes intolerantes a estatinas y no intolerantes a las mismas.
3. Analizar la función específica de los microRNAs en el desarrollo del estrés oxidativo y la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplasmático en cardiomiocitos, así como su implicación en la lesión cardíaca mediada por el estrés del retículo endoplasmático.
4. Evaluar el gen diana específico de los miRNAs y su mecanismo molecular involucrado en la regulación del estrés del retículo endoplasmático y el estrés oxidativo en las células cardíacas.
5. Re-estratificar las variantes genéticas clasificadas previamente como ambiguas para identificar modificaciones que clarifiquen su potencial rol patogénico en la miocardiopatía dilatada.

17 RESULTADOS

17.1 ARTÍCULO 1.

miRNAs circulantes como biomarcadores para la detección de intolerantes a estatinas



Article

A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance

Alipio Mangas ^{1,2,3,†}, Alexandra Pérez-Serra ^{4,5,†}, Fernando Bonet ^{1,2,*}, Ovidio Muñoz ⁶, Francisco Fuentes ^{7,8}, Aurora Gonzalez-Estrada ⁶, Oscar Campuzano ^{4,5,8,9}, Juan Sebastian Rodriguez Roca ³, Elena Alonso-Villa ^{1,2} and Rocio Toro ^{1,2,*}

- ¹ Research Unit, Biomedical Research and Innovation Institute of Cadiz (INIBICA), Puerta del Mar University Hospital, 11009 Cádiz, Spain; alipio.mangas@uca.es (A.M.); elena.alonso@gm.uca.es (E.A.-V.)
 - ² Medicine Department, School of Medicine, University of Cadiz, 11002 Cádiz, Spain
 - ³ Lipid and Atherosclerotic Unit, Internal Medicine Department, Puerta del Mar University Hospital, 11009 Cadiz, Spain; jsrguezroca@gmail.com
 - ⁴ Cardiology Service, Hospital Josep Trueta, University of Girona, 17007 Girona, Spain; aperez@idibgi.org (A.P.-S.); ocampuzano@idibgi.org (O.C.)
 - ⁵ Cardiovascular Genetics Center, University of Girona-IDIBGI, 17007 Girona, Spain
 - ⁶ UCERV, UCAMI, Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen del Rocío, 41013 Seville, Spain; ovidiomuniz@gmail.com (O.M.); aglezestrada@gmail.com (A.G.-E.)
 - ⁷ Lipid and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, 14004 Córdoba, Spain; ffuentes@uco.es
 - ⁸ Centro de Investigación Biomédica en Red, Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
 - ⁹ Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: fbonetmartinez@gmail.com (F.B.); rocio.toro@uca.es (R.T.)
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Mangas, A.; Pérez-Serra, A.; Bonet, F.; Muñoz, O.; Fuentes, F.; Gonzalez-Estrada, A.; Campuzano, O.; Rodriguez Roca, J.S.; Alonso-Villa, E.; Toro, R. A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8146. <https://doi.org/10.3390/ijms23158146>

Academic Editors: Luis M. Blanco-Colio and José Luis Martin-Ventura

Received: 23 June 2022
Accepted: 20 July 2022
Published: 24 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/>).

Abstract: Atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD) are the leading cause of morbidity and mortality in Western societies. Statins are the first-choice therapy for dyslipidemias and are considered the cornerstone of ASCVD. Statin-associated muscle symptoms are the main reason for dropout of this treatment. There is an urgent need to identify new biomarkers with discriminative precision for diagnosing intolerance to statins (SI) in patients. MicroRNAs (miRNAs) have emerged as evolutionarily conserved molecules that serve as reliable biomarkers and regulators of multiple cellular events in cardiovascular diseases. In the current study, we evaluated plasma miRNAs as potential biomarkers to discriminate between the SI vs. non-statin intolerant (NSI) population. It is a multicenter, prospective, case-control study. A total of 179 differentially expressed circulating miRNAs were screened in two cardiovascular risk patient cohorts (high and very high risk): (i) NSI ($n = 10$); (ii) SI ($n = 10$). Ten miRNAs were identified as being overexpressed in plasma and validated in the plasma of NSI ($n = 45$) and SI ($n = 39$). Let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p were overexpressed in the plasma of SI patients. The receiver operating characteristic curve analysis supported the discriminative potential of the diagnosis. We propose a three-miRNA predictive fingerprint (let-7f, miR-376a-3p and miR-376c-3p) and several clinical variables (non-HDLc and years of dyslipidemia) for SI discrimination; this model achieves sensitivity, specificity and area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of 83.67%, 88.57 and 89.10, respectively. In clinical practice, this set of miRNAs combined with clinical variables may discriminate between SI vs. NSI subjects. This multiparametric model may arise as a potential diagnostic biomarker with clinical value.

Keywords: circulating microRNAs; statin intolerance; biomarkers; atherosclerotic cardiovascular diseases; statins-adverse myalgia symptoms

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of mortality and morbidity in Europe [1]. Plasmatic low-density lipoprotein (LDLc) levels is the main causal factor of these vascular events. Statins are the cornerstone of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) prevention worldwide. Based on the evidence of the clinical trials, the European Society of Cardiology (ESC)/European Atherosclerosis Society (EAS) guidelines have established a goal of 50% reduction in LDLc concentration in high and very high cardiovascular risk patients to reduce vascular events [1,2]. Most of the trials have demonstrated a remarkable reduction of 22% of major vascular events after five years of statin treatment [3]. Even so, almost 80% of treated patients do not achieve recommended LDLc levels. This low adherence to statin therapy is due to several causes, including cultural reasons, costs, side effects and lack of effectiveness information [4].

Although statins are well tolerated, the major cause of non-adherence to treatment is its adverse effects. The European Medicine Agency defines statin intolerance as the inability to tolerate at least two or more statins at the lowest approved daily dose due to the development of side effects, that began or increase during statin therapy and stop when statin treatment was discontinued [5]. Among these side effects, statin-associated muscle symptoms (SAMS) are the most prevalent reason for the non-adherence and/or discontinuation of statin treatment [6]. Four SAMS forms have been described, namely myalgia, myopathy, myositis and rhabdomyolysis. Rhabdomyolysis is the most severe form of statin-induced muscle damage. Nevertheless, myalgia—muscle complaints without creatine kinase elevation or major functional loss—is usually self-reported in the range of 7–29% [7]. The mechanisms involved in the pathogenesis of SAMS are still unknown. The lack of a gold standard test or biomarker to diagnose this adverse effect, the inconsistent definition of this reality in clinical practice, and the impact on the cardiovascular event rates after dropping this therapy demonstrate the importance of identifying a novel and accessible biomarker that distinguishes this population [8].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs identified as important regulators of genes involved in several biological processes [9–11]. miRNAs regulate gene expression by degrading messenger RNAs (mRNAs), repressing protein synthesis, or interacting with long non-coding RNAs. Their properties make them the most widely studied extracellular RNAs as diagnostic and therapeutic-tailored markers in the cardiovascular field [12–14]. Several studies have described the relationship between statins and miRNA profiles [15–18], but this is the first time miRNAs have been considered as an alternative diagnostic tool related to statin intolerance detection. Therefore, we aim to determine the role of miRNA as a peripheral biomarker to identify the statin intolerant (SI) population and thus personalize dyslipidemia treatment in these patients at cardiovascular risk.

2. Results

2.1. Clinical Parameters between SI and NSI Patients

The anthropometrical and clinical features of the SI and NSI cohorts are shown in Table 1.

This study included 84 patients, 39 SI patients and 45 NSI patients as the control group. Considering the groups, the male population were larger than the female population in NSI, but SI female (61.5%) were significantly more frequent ($p = 0.01$); in contrast, a lower percentage of females (31%) was observed in the NSI group. There were no significant differences in terms of age. The presence of ASCVD, the years of dyslipidemia (DLP) ($p = 0.003$, respectively), and high blood pressure ($p = 0.006$) were significantly different between cohorts. It is important to note that non-HDLc plasmatic concentration ($p < 0.001$) displayed significant differences between SI and NSI groups. When considering the medication intake, the use of angiotensin agonist receptors ($p = 0.004$), diuretic ($p = 0.003$), beta-blockers ($p < 0.001$), alpha-blockers ($p = 0.03$) and aspirin ($p < 0.001$) was significantly different between SI and NSI cohorts. Regarding the lipid-lowering therapy, the NSI cohort was mostly on Rosuvastatin and, to a lesser degree, on Atorvastatin, among others, such as

3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors or statins. The SI group was treated using alternative lipid-lowering drugs, but nine patients refused to use any other therapeutic option.

Table 1. Baseline demographics, clinical characteristics, and treatment of NSI and SI population. Data are presented as mean $\pm$ SD for continuous variables and as percentage for categorical variables. The difference between NSI and SI patients was evaluated with unpaired Student *t* test ^a, Pearson Chi-square ^b and Wilcoxon test ^c. * Therapy mostly in association. NS, no significant; ACEI: angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB: angiotensin II receptor blockers; ASCVD: atherosclerotic cardiovascular disease; CCB: calcium channel blockers; CPK: creatine kinase; DLP: years of dyslipidemia; MDRD-4: glomerular filtration rates; non-HDLc: non-high-density lipoprotein cholesterol; NSI: non-statin intolerant; OAD: oral antidiabetic drugs; PCSK-9: Monoclonal anti-proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; SI: statin intolerant.

Variables	NSI	SI	<i>p</i> Value
<i>n</i>	45	39	
Demographics			
Age (years) ^a	66.6 $\pm$ 11.5	63.6 $\pm$ 10.9	NS
Sex (female, %) ^b	31	61.5	0.01
DLP (years) ^c	5.6 $\pm$ 6.3	9.1 $\pm$ 7.5	0.003
High blood pressure (%) ^b	73	41	0.006
Diseases			
Diabetes Mellitus (%) ^b	38	20.5	NS
ASCVD (%) ^b	71	13	<0.001
Chronic kidney disease (%) ^b	18	12.8	NS
Analytical profile			
Basal blood glucose ^a	118.5 $\pm$ 36.2	110 $\pm$ 44.6	NS
Non-HDLc (mg/dL) ^a	104.9 $\pm$ 32.7	169.9 $\pm$ 63.5	<0.001
Triglycerides (mg/dL) ^a	151.7 $\pm$ 97.4	164 $\pm$ 93	NS
MDRD-4 (mL/min) ^a	76.5 $\pm$ 25.6	82 $\pm$ 31.6	NS
Transaminase GOT (U/L) ^a	23.1 $\pm$ 13	23.5 $\pm$ 8	NS
Transaminase GPT (U/L) ^a	27.3 $\pm$ 23	24.6 $\pm$ 18.9	NS
CPK (U/L) ^a	82.8 $\pm$ 40.4	165.9 $\pm$ 14.7	NS
Medication			
ACEI (%) ^b	11	2.5	NS
ARB (%) ^b	67	33.3	0.004
OAD (%) ^b	33	18	NS
Insulin (%) ^b	11	10.5	NS
Diuretic (%) ^b	51	18	0.003
CCB (%) ^b	31	18	NS
Beta-blockers (%) ^b	62	15.4	<0.001
Alpha-blockers (%) ^b	22	5	0.03
Aspirin (%) ^b	64	18	<0.001
Atorvastatin 40 mg (%)	20	-	
Atorvastatin 80 mg (%)	15.5	-	
Rosuvastatin 10 mg (%)	17.7	-	
Rosuvastatin 20 mg (%)	35.5	-	
Pitavastatin 4mg (%)	6.6	-	
Simvastatin 40 mg (%)	4.4	-	
PCSK9 inhibitors: Evolocumab (%) ^b	13	7.6	NS
PCSK9 inhibitors Alirocumab (%) ^b	11	2.5	NS
Fenofibrate (%) ^b	18	7.6	NS
Omega-3 (%)	-	5.1	
Colesevelam (%)	-	2.5	
Colestiramine (%)	-	12.8	
Armolid plus * (%)	-	41.0	
Ezetimibe 10 mg * (%) ^b	42	38	NS
Acenocumarol (%) ^b	7	7.6	NS

2.2. Plasma miRNA Profile in Patients with SI

To assess whether the plasma miRNAs were differentially expressed between the groups, we first conducted screen profiling of 179 circulating miRNAs commonly found in human plasma in ten SI and ten NSI age-matched patients (Figure 1). The established criteria for the selection of miRNA candidates were high expression levels (median Cq < 35 and detected in at least 80% of all samples) and statistical significance ($p < 0.05$). A total of 10 miRNAs, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-128-3p, miR-186-5p, miR-30e-3p, miR-376a-3p, miR-376c-3p, miR-543 and miR-574-3p, were significantly expressed according to the selection criteria and selected for further analysis.

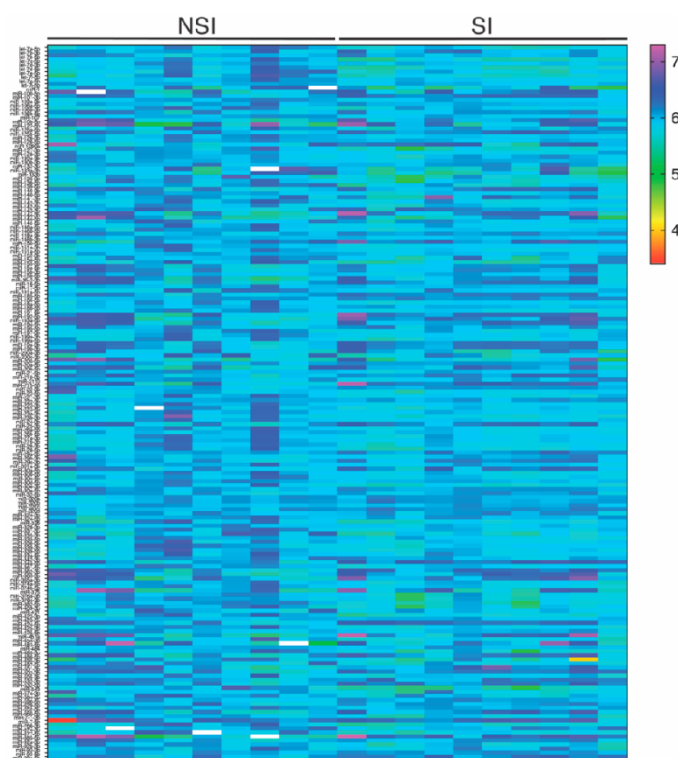


Figure 1. Color heatmap based on raw miRNA expression values where each column represents a patient, and each row represents a miRNA. The color scale illustrates the relative expression level of miRNAs (red and yellow represent low expression and blue and purple represent high expression). MiRNA expression levels were normalized to miR-148a-3p and let-7b-5p. MiRNA: microRNA; NSI: non-statin intolerant; SI: statin intolerant.

2.3. miRNAs Validation Study and Their Correlation with Clinical Parameters

We validated these ten miRNAs in 45 SI and 39 NSI individuals to confirm the diagnostic robustness to discriminate between NSI and SI patients. Our results showed that let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p were significantly upregulated in plasma from SI cohort versus NSI (Figure 2).

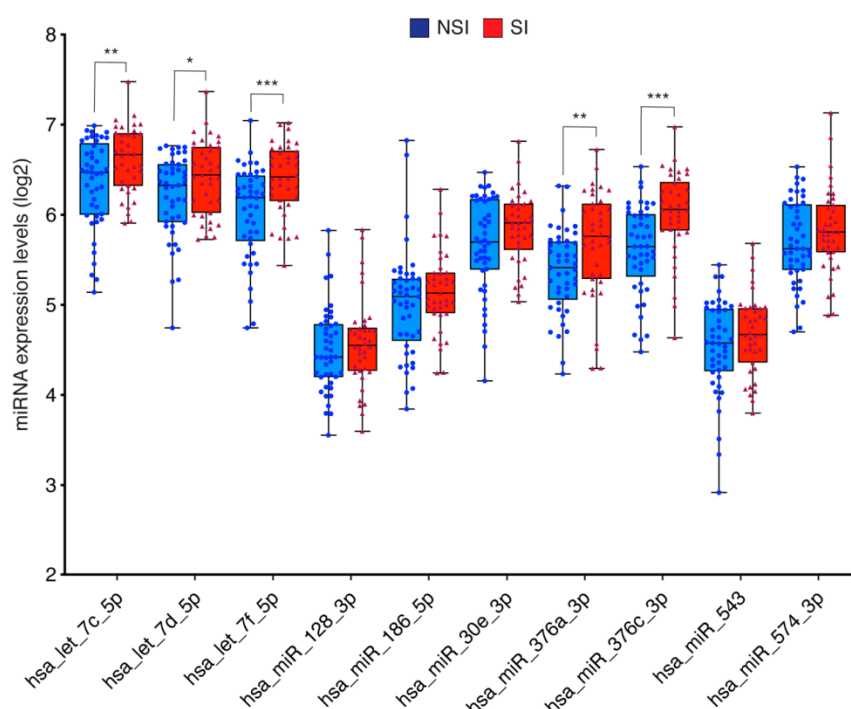


Figure 2. Boxplots of miRNA expression levels in NSI and SI cohorts. The analysis was carried out using qPCR. Data are presented in log2. Data represent the mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$. Error bars represent SDs. NSI, non-statin intolerant; SI: statin intolerant.

We investigated the association between the differentially expressed miRNAs and some significant clinical parameters in the SI group. No correlation was found but DLP and non-HDLc levels (Table 2).

Table 2. Correlation between the clinical parameter (DLP and non-HDLc) and individual microRNAs in SI subjects. DLP: years of dyslipidemia; non-HDLc: non-high-density lipoprotein cholesterol SI: statin intolerant. Coefficient significant at $p < 0.05$.

microRNAs	SI Cohort			
	DLP (Years)		Non-HDLc (mg/dL)	
	Pearson r	p	Pearson r	p
Let-7c-5p	−0.164	0.281	0.177	0.244
Let-7d-5p	−0.079	0.603	0.226	0.131
Let-7f-5p	−0.136	0.368	0.168	0.266
miR-376a-3p	−0.173	0.250	0.103	0.498
miR-376c-3p	−0.265	0.079	0.176	0.248

2.4. Circulating miRNA as a Biological Marker of SI

We assess the ability of the differentially expressed circulating miRNAs to distinguish between SI and NSI patients using the AUC-ROC. Figure 3A shows that miR-376c-3p achieved the highest AUC with a value of 0.736 (95% CI: 0.627–0.845; $p < 0.001$), indicating a moderate performance. Let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p and miR-376a-3p display AUC

values of 0.652, 0.627, 0.688 and 0.682, respectively. Afterwards, we consider the diagnostic potential of the 5-miRNA set to differentiate between SI and NSI individuals. The AUC for the combination value of our miRNA panel (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p) was 0.936 (95% CI: 0.887–0.985; $p < 0.001$) (Figure 3B), improving the diagnostic ability. The sensitivity, specificity and accuracy of each miRNA and the 5-miRNA panel are shown in Table 3.

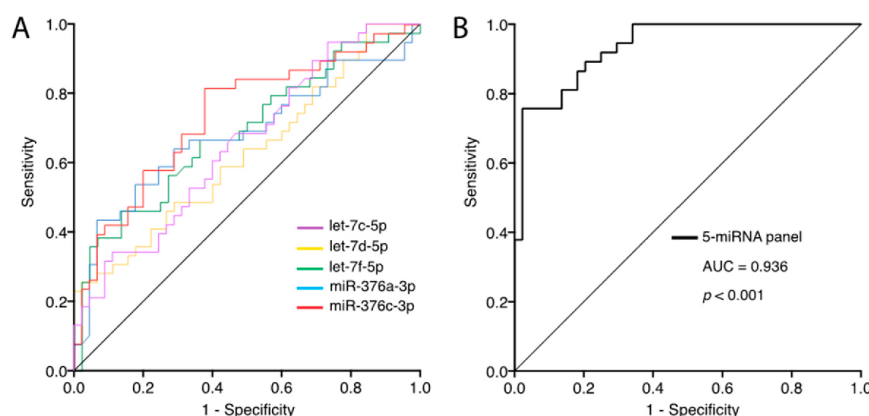


Figure 3. ROC curves for evaluating the predictive performance of differentially expressed miRNAs to discriminate between SI vs. NSI. (A) ROC curves for let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p. (B) The ROC curve of the 5-miRNA panel combination value of let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p. AUC: area under the curve; miRNA: microRNA; NSI: non-statin intolerant; SI: statin intolerant.

Table 3. Assessment of the potential diagnostic value of differentially expressed miRNAs and the 5-miRNA panel (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p) as biomarkers to categorize statin intolerant patients. AUC: area under the curve; CI: confidence interval; miRNA: microRNA.

miRNA	AUC (95% CI)	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %	p Value
Let-7c-5p	0.652 (0.535 to 0.770)	61.70	55.56	59.04	0.017
Let-7d-5p	0.627 (0.507 to 0.747)	52.63	58.70	55.95	0.046
Let-7f-5p	0.688 (0.573 to 0.803)	60.53	64.44	62.65	0.003
miR-376a-3p	0.682 (0.563 to 0.800)	68.89	64.10	66.67	0.004
miR-376c-3p	0.736 (0.627 to 0.845)	70.45	64.10	67.47	<0.001
5-miRNA panel	0.936 (0.887 to 0.985)	81.25	84.85	82.72	<0.001

2.5. Combination of miRNAs, Years of Dyslipidemia and Non-HDLc to Categorize SI Patients

We investigated the potential value of the miRNA candidates to discriminate between the SI vs. the NSI cohort and their association with some clinical parameters. Only years of DLP and non-HDLc levels were significantly higher in SI patients (Figure 4A,B). We assess the potential of these two clinical parameters to distinguish between SI and NSI groups. The ROC curves of these factors, DLP and non-HDLc, showed AUC values of 0.700 and 0.807, respectively, indicating a moderate performance to discriminate SI from NSI patients, whereas the combination of these two parameters achieved an AUC value of 0.844 (Table 4). We developed a multivariate model to increase the diagnostic power to discriminate between SI vs. NSI combining differentially expressed miRNAs, DLP and/or non-HDLc plasmatic levels. The diagnostic performance of the 5-miRNA panel was only slightly improved with DLP as, although the AUC value was similar, this model achieved an accuracy of 84.81% against the 82.72% shown by the 5-miRNA panel (Figure 4C,D). In contrast, the diagnostic ability of the 5-miRNA set and the non-HDLc concentration

was lower than that of the 5-miRNA panel by itself, showing an AUC value of 0.855. Interestingly, the combination of the 3-miRNA panel composed of let-7f, miR-376a-3p and miR-376c-3p, and DLP plus non-HDLc reached the highest diagnostic performance with an AUC value of 0.954 and an accuracy of 89.47% (Figure 4D and Table 4). We next use the Weka data mining tool to evaluate the performance of our model using 10-fold cross-validation. We ran all classifiers in Weka and, the most successful algorithm was Ada Boost M1 achieving a mean training accuracy, sensitivity, specificity, MCC and AUC of 86%, 83.67%, 88.57%, 0.714 and 0.891, respectively, keeping higher diagnostic value than the 5-miRNA panel model (Figure 5).

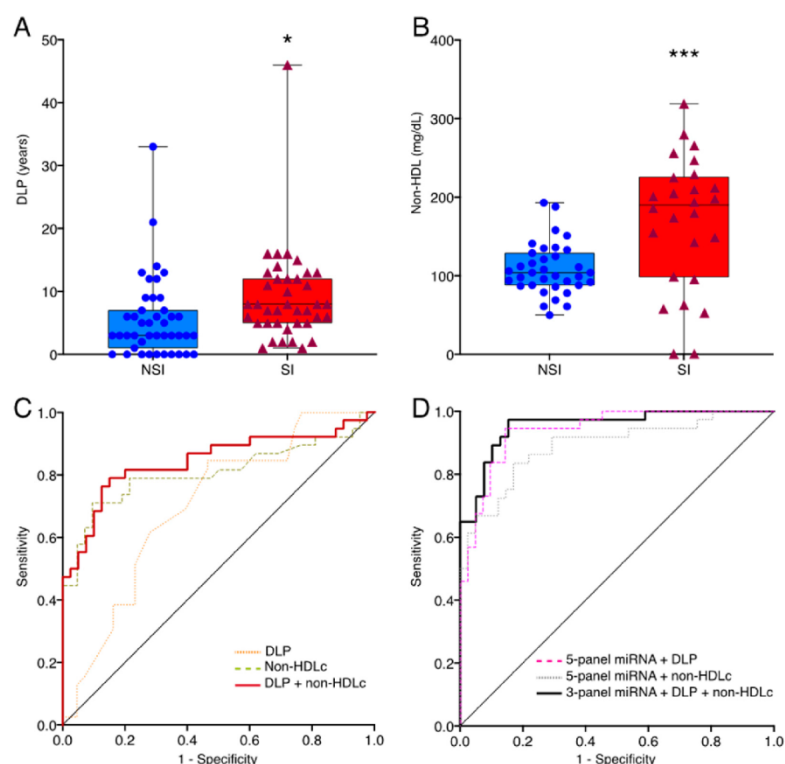


Figure 4. ROC curves for evaluating the predictive performance of clinical factors with differentially expressed miRNAs. (A) Box plot of DLP in NSI ($n = 45$) and SI ($n = 39$) subjects. (B) Box plot of non-HDLc levels in NSI ($n = 45$) and SI ($n = 39$) subjects. (C) ROC curves for each clinical parameter, DLP and non-HDLc, and for the association of DLP plus non-HDLc. (D) The ROC curve of the combined value of the 3-miRNA panel (let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p), DLP and non-HDLc plasmatc concentration. DLP: years of dyslipidemia SI: statin intolerant; NSI: non-statin intolerant; non-HDLc: non-high-density lipoprotein cholesterol. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.

Table 4. Evaluation of the potential of clinical parameters (DLP and non-HDLc) and the multivariate models as SI biomarkers. AUC, area under the curve; CI, confidence interval. DLP: years of dislipidemia; miRNA: microRNA; non-HDLc: non-high-density lipoprotein cholesterol.

Multiparametric Model	AUC (95% CI)	Sensitivity %	Specificity %	Accuracy %	p Value
DLP (years)	0.700 (0.587 to 0.814)	57.89	60.00	58.54	0.017
Non-HDLc (mg/dL)	0.807 (0.703 to 0.911)	77.08	84.38	80.00	<0.001
DLP + non-HDLc	0.844 (0.751 to 0.937)	79.55	85.29	82.05	<0.001
5-miRNA panel + DLP	0.940 (0.892 to 0.989)	85.71	83.78	84.81	<0.001
5-miRNA panel + non-HDLc	0.889 (0.814 to 0.964)	85.00	81.08	83.12	<0.001
3-miRNA panel + DLP + non-HDLc	0.954 (0.911 to 0.998)	89.74	89.19	89.47	<0.001

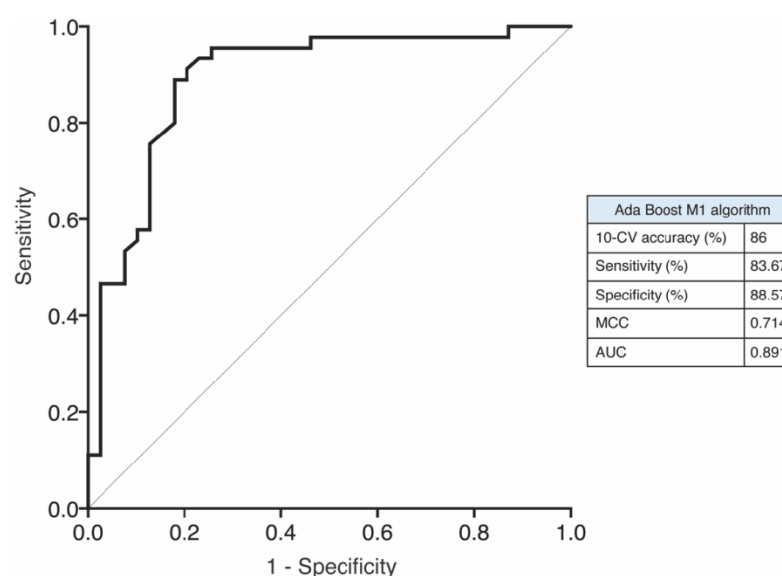


Figure 5. ROC curve of 10-fold cross validation test for 3-miRNA panel + DLP + non-HDLc model (Ada Boost M1).

2.6. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathway and Gene Ontology Enrichment Analysis

We next investigated the biological significance of the five differentially expressed miRNAs using GO enrichment and KEGG pathway analysis. We used the miRNet online software (<https://www.mirnet.ca>, accessed on 9 November 2021) to predict the putative targets of let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p. The let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p were associated with 516, 394, 397, 112 and 84 mRNAs in the miRNet database, respectively. Interestingly, one mRNA target, IGF1R, was shared by these five miRNAs (Figure 6A,B). GO analysis using the WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit) computational tool showed significant enrichment of biological processes related to response to nerve growth factor and dendrite development, cell cycle, gene silencing and response to transforming growth factor-beta (TGF- β), among others (Figure 6, left panel). KEGG pathway analysis showed several pathways, the most significant of which are the p53 signaling pathway, Forkhead members of the O class (FoxO) signaling pathway [19,20], EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, and glioma (Figure 6C, right panel). Finally, disease enrichment analysis identified that these five miRNAs might be involved in leukemia, mitochondrial myopathy, lactic acidosis and diabetes mellitus (noninsulin-dependent), among others (Figure 6C, bottom panel).

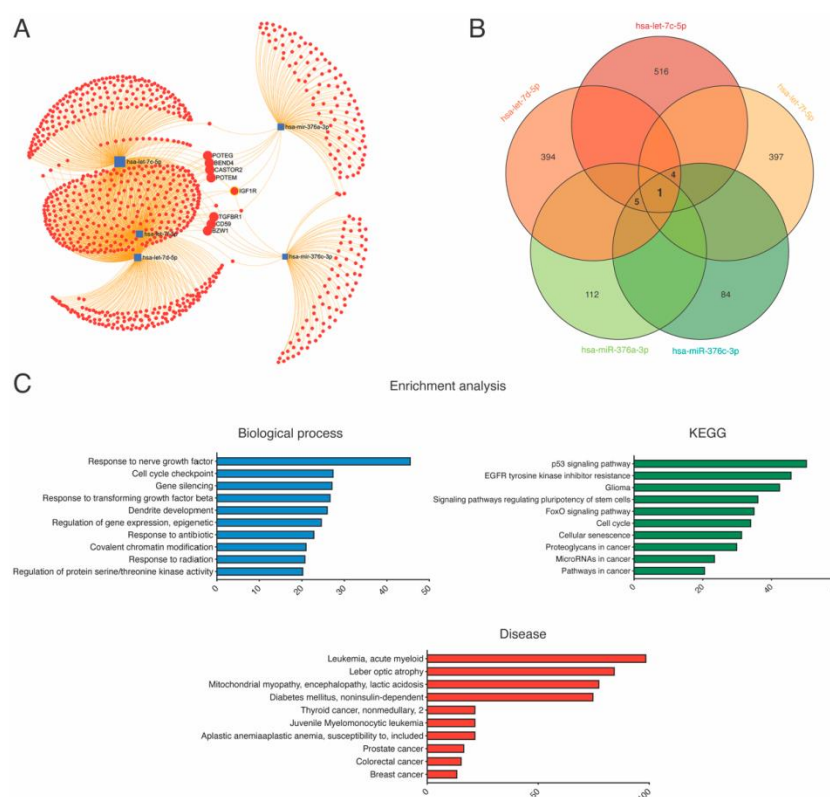


Figure 6. KEGG and GO analysis of differentially expressed miRNAs. (A) miRNA-gene network for let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p. (B) Venn diagram showing overlap of gene targets of let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p. (C) GO and KEGG functional enrichment analysis of let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p.

3. Discussion

We investigated the circulating miRNA signature of a high and very high cardiovascular risk population treated with statins. We report, for the first time, a fingerprint of miRNAs (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p) to discriminate between SI and NSI patients. Moreover, when we add some clinical information, this circulating miRNA set increases its accuracy remarkably.

Statins are by far the most important therapy used for the treatment and prevention of cardiovascular diseases. Statins have widely proven their profits in primary and secondary cardiovascular prevention [1–3]. Although usually well tolerated, statin dropout rates and non-adherence are high after the first year of therapy, 43% and 24%, respectively [21]. The main reason is SAMS which leads to neglect of the treatment and dropout [22] and dramatically increases cardiovascular morbidity and mortality [5,23].

The identification of SI patients is crucial to avoiding cardiovascular risk and reaching the aims established by the guidelines [2]. These patients need to be focused differently in order to prevent the adverse impact of statins and atherosclerosis over the years. However, the current clinical diagnosis of SI has limitations. Clinically, there are no clues to suspect who will present this condition. Myotoxicity shows very heterogeneous manners, and the phenotype that includes myalgia is the most common. SAMS affects symmetrical groups of

muscles such as pelvic and shoulder girdles or limbs; muscular weakness, cramps, and, more rarely, increased creatinine kinase plasmatic levels may be considered an adverse effect [24]. Some studies have proposed various scores to assess myalgia [25–27]. Several pathological paths have been suggested to explain statins' toxicity as the mitochondrial dysfunction through Co-enzyme Q10 deficiency, the reduction in beta-oxidation of fatty acids, the promotion of muscular apoptosis, drug–drug interaction, exercise, or certain genetic polymorphisms [22]. The lack of knowledge of the underlying pathological mechanism that leads to SAMS impedes any preventive measures. Thus, the difficulty reaching a clinical diagnosis, the lack of circulating markers or non-invasive tests to detect this side-effect, and the dropout of the preventive therapy leads to a crucial need for a tool that solves this problem. Some groups have related miRNAs with the effectiveness of different statins, and their pleiotropic effect on the endothelial cells [28–31]. To our knowledge, the use of circulating miRNAs as a diagnostic tool for SI detection remains unexplored.

In the present study, five plasmatic miRNAs, (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p) were identified as being enriched in SI patients as compared with NSI. Moreover, together, these miRNAs showed a promising potential to discriminate between SI and NSI cohorts. Thus, let-7c-5p is involved in muscle attenuation through the TGF- β factor; its intracellular effector Smad3 is known to inhibit myogenesis and stimulate adipogenesis and myofiber lipid accumulation [32,33]. Let-7f-5p, regulated by the FoxO transcription factors family, is overexpressed in myasthenia gravis in muscle-specific tyrosine kinase antibody seropositive [34]. Myasthenia gravis is a neuromuscular autoimmune disease caused by antibodies which attack receptors at the neuromuscular junction. MiR-376a-3p, proposed as a biomarker of coronary artery disease, acts by nuclear receptor-interacting protein 1 (NRIP1) leading to the cellular apoptosis. Hence, miR-376a-3p might be related to the effect of statins reducing the risk of coronary artery disease, however, this hypothesis needs to be investigated [35]. Related to statin toxicity, others circulating miRNAs have been described as miR-499 and miR-145 [36]. In 2016, Min et al., using combined *in vivo* and *in vitro* modelling, demonstrated a release of miR-499-5p linked to muscle injury during exercise when muscular contraction induced by carbachol is combined with statins intake. Circulating levels of miR-1, miR-133a and miR-206 were significantly upregulated in patients in statin therapy who practiced endurance sports and showed muscular adverse effects [37]. Fu et al. demonstrated the statin-induced injury on the skeletal muscle through the overexpression of miR-1a by regulating the mitogen-activated kinase 1 (MKK1) pathway [38]. Some murine models have been used to demonstrate that moderate and gradual exercise may have a beneficial role on statin intake and its impact on skeletal muscle [39,40].

In the biological process analysis, we identified that these miRNAs were highly enriched with genes in the TGF- β pathway, suggesting that they are plausible candidates. Recently, has been reported that TGF- β through Smad3 transcriptional repression leads to the inhibition of myogenesis differentiation [41,42]. Myogenic differentiation and function may need several cellular signal and growth factors, but also an appropriate environment that may be impaired by statins.

The genes predicted to be impacted by these five miRNAs are shown in Figure 6. All miRNAs described, except let-7f-5p, shared POTE1, BEND4, POTE2 and CASTOR that are genes linked with muscular homeostasis and apoptotic processes. In this sense, CASTOR2, among other genes, has been described as a target of the proteolytic pathway of FoxO driving to muscular atrophy [43]. TGF β RI, common to all miRNAs except miR-376a-3p, has been reported to affect the muscular growth and differentiation [44]. TGF β signaling plays a critical role in regulating muscle growth and atrophy, in both inherited and acquired myopathies [45]. It is important to note that miRNA target prediction analysis identified insulin-like growth factor (IGF1) as a target gene shared by these five miRNAs. Several studies have reported that statins regulate IGF1-R signaling at different levels [46–48]. AKT is a key-regulator of the synthesis and degradation muscle growth and regeneration through AKT/mTOR and FoxO transcription factors [49].

IGF1 is related to statin myotoxicity by inhibiting the IGF1/AKT pathway leading to an increased myofibrillar proteins degradation, impaired proteins synthesis. Thus, statins inhibit AKT phosphorylation activates caspases and PAPR inducing apoptosis and, most importantly, are closely associated with the inhibition of cholesterol synthesis at the level of hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG)-CoA reductase. These findings have been demonstrated in both in vitro and in vivo models, enhancing the importance of these pathways in statin-induced myotoxicity [49]. FoxO are a family of transcription factors that are targeted by these miRNAs. They are implicated in the protein degradation and apoptosis. FoxO are related to muscular atrophy and cachexia with the use of certain chemotherapy treatments through the IGF1/AKT/FoxO pathways [50]. Finally, GO enrichment analysis revealed significant enrichment of mitochondrial myopathy-related diseases. In agreement with this, numerous studies have shown that mitochondria play an important role in statin-induced myopathies. Moreover, it has been suggested that statins may have major effects on mitochondrial function, and some of their adverse effects might be mediated through mitochondrial pathways [51–53]. Hence, our data suggest that these circulating miRNAs might be involved in the mechanisms of action of statins on mitochondrial function.

In this study we demonstrate that a panel of five miRNAs have a better performance in predicting patients with SI than individual miRNAs. To the best of our knowledge, these five circulating miRNAs have not been reported to be associated with SI. Moreover, we present a multiparametric model that increases the discriminative power of this diagnostic tool in clinical practice. We worked with several clinical parameters and a combination of miRNAs. Thus, our miRNAs set, let-7f-5p, miR-376a-3p and miR-376c-3p, with two clinical parameters such as DLP and non-HDLc concentration showed a high-yield diagnostic accuracy with an AUC of 0.954 and an accuracy of 89.47%. A 10-fold cross-validation evaluation to estimate the prediction performance resulted in high diagnostic accuracy (86%) with an AUC of 0.891 supporting the robustness of the multiparametric model.

Non-HDLc, a reliable marker for cardiovascular risk and residual risk, encompasses all lipoproteins that contain cholesterol and apo B, being closely related to atherogenic dyslipidemia. Thus, in any clinical context associated with insulin resistance, such as diabetes mellitus 2, metabolic syndrome or visceral obesity, it is suggested to use non-HDLc or apo B as a therapeutic aim rather than classic LDLc [54]. This highlights the importance of this non-HDLc for better control of dyslipidemia [2] and an update of the risk calculation indices has recently been published SCORE2 [55] and SCORE2-OP [56]. This update introduces different variations on the original SCORE index assessing not only cardiovascular mortality but the risk of developing a cardiovascular event. In this sense, non-HDLc has been enhanced as a major cardiovascular risk factor with the same impact as LDLc or global cholesterol. Thus, non-HDLc levels are equivalent in terms of risk to high blood pressure, diabetes mellitus or chronic kidney disease. On the other hand, DLP play a key role in ASCVD. The time of exposition to a reduced LDLc concentration is independent of the reduced mechanism used; the clinical benefit to more decreased LDLc levels, whether genetically or pharmacologically, is determinant; the lower and the earlier the better [57].

We expose a circulating miRNAs fingerprint as an accessible and helpful tool for SI diagnosis. In addition, we propose a multiparametric model, a panel of three miRNAs and two clinical parameters, that detects patients with this adverse event with the highest diagnostic value reported to date. The bioinformatics analysis leads to the biological and molecular processes present in this entity. This proposal permits a therapy-tailored strategy to avoid the dropout of a crucial therapy and offer an alternative to treat patients with high cardiovascular risk.

Our current study has several limitations. Firstly, our sample was prospectively recruited from the outpatient clinic. The size of the study sample, recruited from various Lipid Units and Cardiology Departments, did not allow us to obtain a robust multivariate logistic regression model. Furthermore, a larger sample size is needed to validate these data. As a consequence, these results should be extended and replicated to a larger population before the novel biomarkers can be routinely applied in clinical practice. Finally, even

though databases registered the expression of the parental genes, we have no confirmation about the direct secretion of these circulating miRNAs into the extracellular space. Hence, the association of miRNAs with SI and all the interactions are putative. Therefore, larger confirmative studies on circulating miRNAs are needed to generate a better, reproducible prognostic signature for SI.

4. Materials and Methods

4.1. Study Population and Design

This is a multicenter prospective case-control study. Patients were recruited from three field centers (Puerta del Mar University Hospital, Cádiz; Virgen del Rocío University Hospital, Sevilla; and Reina Sofia University Hospital of Córdoba, Spain). Inclusion criteria were patients over 18 years old with a high and very high cardiovascular risk in treatment with statins referred to the Lipid Unit of these centers. We have focused on the most frequent symptom, SAMS [5]. A total of 84 consecutive subjects (Figure 7) were included and divided into two different cohorts: (i) SI patients ($n = 39$) and, (ii) patients non-intolerant to statins (NSI) ($n = 45$). SI group was defined based on the European Medicine Agency criteria [5]. Before including these patients in the study, we applied the 2019 ESC/EAS Lipid Management Guidelines, which establish the requirement to offer the patient alternative dosing such as every other day or twice a week with Atorvastatin, Pitavastatin or Rosuvastatin. All patients included dropped out of the alternative proposed due to intolerance to statins. All patients recruited were high or very high cardiovascular risk based on the classification of the cardiovascular risk grade of the ESC/EAS guidelines (Table 5) [2]. ASCVD can be documented as either clinical or unequivocal based on imaging. In the clinical branch, ASCVD includes previous acute coronary syndrome (myocardial infarction or unstable angina), stable angina, coronary revascularization procedures including percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass graft or arterial revascularization procedures, ischemic stroke, and peripheral arterial disease. Conditions considered to explicitly document ASCVD on imaging include findings known to be predictive of clinical events, such as significant plaque on coronary angiography or coronary tomography scan (a multivessel coronary disease with two major epicardial arteries having >50% stenosis) or on carotid ultrasound.

Table 5. Cardiovascular risk criteria based on the 2019 ESC/EAS guidelines used to the recruitment of patients [2]. ASCVD: atherosclerotic cardiovascular disease; DM: diabetes mellitus; CKD: chronic kidney disease; CVD: cardiovascular disease; eGFR: estimated glomerular filtration rate; FH: familial hypercholesterolemia; SCORE: Systematic coronary risk estimation. Adapted from Ref. [2]. Copyright 2019. The European Society of Cardiology and the European Atherosclerosis Association 2019.

Very High CVD Risk	High CVD Risk
Presence of ASCVD clinically/imaging.	Total cholesterol over 310 mg/dL, LDLc over 190 mg/dL or blood pressure $\geq 180/110$ mmHg.
DM patients with target organ damage or at least three major risk factor or early onset of DM type 1 with a length over 20 years.	DM patients without target organ damage. Over 10 years with DM.
Severe CKD (eGFR < 30 mL/min/1.73 m ²).	Moderate CKD (eGFR = 30–39 mL/min/1.73 m ²).
A calculated SCORE $\geq 10\%$ for 10 years risk of fatal CVD.	A calculated SCORE $\geq 5\%$ and $< 10\%$ for 10 years' risk of fatal CVD.
FH with a ASCVD or with another major risk factor.	FH without any other major risk factor.

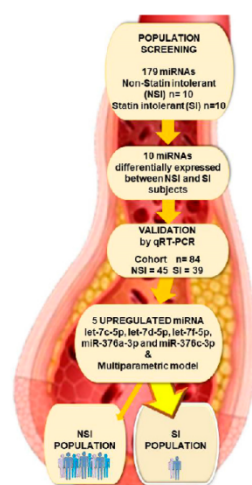


Figure 7. The flowchart of the study design. This figure illustrates the experimental workflow of the study including screening and validation. MiRNA: microRNA; NSI: non-statin intolerant; SI: statin intolerant.

Exclusion criteria were patients over 80 years old or with marked frailty, intensive physical activity, heavy alcohol consumption and patients who presented chronic inflammatory, autoimmune or neoplasia disease or other pharmacological therapies that interfere with the metabolic pathways of the different statins. Subjects with high training exercise workload, previous muscular symptoms, myopathy disease, high levels of creatine kinase levels or hypothyroidism were excluded from the study.

Detailed anthropometric, clinical and pharmacological information was obtained from each subject including cardiovascular risk factors and previous vascular events. All patients performed a blood test including thyroid, hepatic, kidney, lipid profiles and creatine kinase at the inclusion moment. Our institution's ethics committee (Comité de Ética de la Investigación de Cádiz) approved the study protocol. The study was performed in full compliance with the Helsinki II Declaration. All participants provided written informed consent.

4.2. Blood Collection

Ten milliliters of peripheral blood were collected in K2-ethylenediaminetetraacetic acid tubes after 10 h overnight fasting and were immediately centrifuged ($1500 \times g$, 15 min, 4°C). The blood was processed within 4 h after isolation. The upper layer containing plasma was divided into aliquots and stored at -80°C until further analysis.

4.3. RNA Isolation

Total RNA was extracted from 200 μL of plasma using the miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A total of 200 μL of plasma aliquots were used to obtain enough final volume. During the extraction, 3.5 μL of miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (1.6×10^8 copies/ μL of the *C. elegans* miR-39 miRNA mimic) were added to each sample as an internal control. RNA was eluted in 20 μL of RNase-free water.

4.4. MiRNA Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

To evaluate miRNA expression levels and profiles of SI and NSI groups, an analysis of 179 miRNA species known to be present in human serum was performed using

miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) for reverse transcription, miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen) for quantitative real-time (qRT-PCR) amplification and Human Serum/Plasma Focus, miRCURY LNA miRNA Focus PCR panels (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Raw cycle threshold (Cq) values were inter-plate calibrated using UniSp3. Cqs above 35 cycles were censored at the minimum level observed for each miRNA. As housekeeping miRNA for data normalization, we selected the most stably expressed pair of miRNAs (miR-148a-3p and let-7b-5p) as determined by the Normfinder algorithm [58]. Accordingly, each single miRNA was normalized as $\Delta Cq = \text{mean}(\text{Cq}_{\text{miR-148a-3p}} \text{ and } \text{let-7b-5p}) - \text{Cq}_{\text{miRNA}}$. MiRNA levels were log-transformed before being used in the statistical analyses.

4.5. Validation of miRNA Profiles

For the validation study, each selected miRNA candidate was quantified using miRCURY LNA miRNA Custom PCR Panels (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was reverse transcribed using the miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany). qRT-PCR was performed using miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), as previously described [59] and amplification curves were evaluated with CFX Manager™ software (BioRad). The specificity of the amplification was corroborated by melting curve analysis.

4.6. miRNA-Gene Network Analysis

The miRNAs obtained were tested using the miRNet database (<https://www.mirnet.ca>, accessed on 9 November 2021) to predict the targeted genes. A database analysis to identify the biological function was performed using gene ontology (GO) enrichment analysis (<http://geneontology.org/>, accessed on 9 November 2021) [60] and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) <http://www.genome.jp/kegg/>, accessed on 9 November 2021) [61]. The Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) database (<http://www.string-db.org/>, accessed on 9 November 2021) [62] was used to analyze the protein–protein interaction networks.

4.7. KEGG and GO Term Enrichment Analysis

The miRNet online software (<https://www.mirnet.ca>, accessed on 9 November 2021) was used to predict the targeted genes and to construct the miRNA–mRNA regulatory network. The WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) [63] computational tool was performed for KEGG pathway and GO terms analysis. GO term analysis was employed to determine the involvement of the 5 differentially expressed miRNAs in biological processes and diseases.

4.8. Statistical Analysis

Continuous variables are shown as mean $\pm$ standard deviation. Categorical variables are expressed as frequency and percentage of patients (%). Outliers were identified through the Rout method, using a $Q = 1\%$ [64]. The normal distribution of each variable was verified with the Shapiro–Wilk test. Intergroup comparisons of miRNAs levels were performed using non-parametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis rank tests for continuous variables. An analysis of differences between groups was performed using the analysis of variance. ROC curves that characterize the diagnostic performance of candidate miRNAs and logistic regression models were plotted to determine the area under the curve (AUC) and the specificity and sensitivity of the optimal cut-offs. ROC curves were generated by plotting sensitivity against 1-specificity. Data were presented as the AUC and 95% confidence intervals. The changes in p -values of their variables were evaluated by the Wald test and a likelihood ratio. Training was performed with 10-fold cross-validation using Waikato environment for knowledge analysis (Weka) data mining tool. The statistical software package R was used for all analyses (Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.r-project.org>, accessed on 9 November 2021).

5. Conclusions

In conclusion, we identified for the first time a signature of five miRNAs differentially expressed in the SI population. Our multiparametric model also combined circulating miRNAs and clinical variables, and emerges as a potential clinical tool to identify patients with muscular toxic effects as a result of statins. In daily practice, this panel with accessible clinical parameters may improve the accuracy and may lead to a tailored-treatment strategy improving the cardiovascular risk and outcome of these patients.

Author Contributions: R.T. and A.M. conceived the experiments; A.M., O.M., FF, A.G.-E., J.S.R.R., O.C., A.P.-S. and E.A.-V. recruited the subjects; F.B. and A.P.-S. conducted the experiments, and analysed the results; R.T., A.M., F.B. and A.P.-S. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants in the framework of the European Regional Development Fund (ERDF) Integrated Territorial Initiative (ITI PI0048-2017 and ITI PI0017-2019), a research grant from the Spanish Society of Cardiology for Basic Research in Cardiology (PI0012-2019), Plan Propio de INIBICA (PI-INBICA 2019-13), Foundation Progreso y Salud PEER (2020-019).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Andalusian Ethic Committee Board (protocol code FIB-ATO 2018-01; date of approval 3 May 2010).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients for paper publication.

Data Availability Statement: Data transparency is guaranteed. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. We used various software for functional enrichment and statistical analysis. All of them are cited in our manuscript.

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

Ethics Approval: The study protocol was approved by the Andalusian Biomedical Research Ethics committee. The study was performed in full compliance with the Declaration of Helsinki.

Abbreviations

ACEI	Angiotensin-converting enzyme inhibitors
ARB	Angiotensin II receptors blockers
ASCVD	Atherosclerotic cardiovascular diseases
AUC	Area under the ROC curve
CCB	Calcium channel blockers
CI	Confidence interval
CPK	Creatine kinase
CVC	Cardiovascular disease
DLP	Years of dyslipidemia
ESC	European Society of Cardiology
EAS	European Atherosclerosis Society
FoxO	Forkhead members of the O class family
GO	Gene Ontology
HDLc	High-density lipoprotein cholesterol
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LDLc	Plasmatic low-density lipid
miRNAs	MicroRNAs
Non-HDLc	Non-HDL cholesterol
NSI	Non-statin intolerant
SAMS	Statin-associated muscle symptoms
SD	Standard deviation
SI	Statin intolerant
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes

References

1. Catapano, A.L.; Graham, I.; De Backer, G.; Wiklund, O.; Chapman, M.J.; Drexel, H.; Hoes, A.W.; Jennings, C.S.; Landmesser, U.; Pedersen, T.R.; et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2999–3058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Mach, F.; Baigent, C.; Catapano, A.L.; Koskinas, K.C.; Casula, M.; Badimon, L.; Chapman, M.J.; De Backer, G.G.; Delgado, V.; Ference, B.A.; et al. ESC Scientific Document Group (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 111–188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration; Baigent, C.; Blackwell, L.; Emberson, J.; Holland, L.E.; Reith, C.; Bhatt, N.; Peto, R.; Barnes, E.H.; Keech, A.; et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* **2010**, *376*, 1670–1681. [\[CrossRef\]](#)
4. Banach, M.; Stulc, T.; Dent, R.; Toth, P.P. Statin non-adherence and residual cardiovascular risk: There is need for substantial improvement. *Int. J. Cardiol.* **2016**, *225*, 184–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Rosenson, R.S.; Baker, S.K.; Jacobson, T.A.; Kopecky, S.L.; Parker, B.A. The National Lipid Association's Muscle Safety Expert Panel. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. *J. Clin. Lipidol.* **2014**, *8*, S58–S71. [\[CrossRef\]](#)
6. Toth, P.P.; Granowitz, C.; Hull, M.; Anderson, A.; Philip, S. Long-term statin persistence is poor among high-risk patients with dyslipidemia: A real-world administrative claims analysis. *Lipids Health Dis.* **2019**, *18*, 175. [\[CrossRef\]](#)
7. Stroes, E.S.; Thompson, P.D.; Corsini, A.; Vladutiu, G.D.; Raal, F.J.; Ray, K.K.; Roden, M.; Stein, E.; Tokgözoğlu, L.; Nordestgaard, B.G.; et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel (2015). Statin-associated muscle symptoms: Impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 1012–1022. [\[CrossRef\]](#)
8. Zhang, H.; Plutzky, J.; Shubina, M.; Turchin, A. Continued Statin Prescriptions after Adverse Reactions and Patient Outcomes: A Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* **2017**, *167*, 221–227. [\[CrossRef\]](#)
9. Henning, R.J. Cardiovascular Exosomes and MicroRNAs in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2021**, *14*, 195–212. [\[CrossRef\]](#)
10. Mellis, D.; Caporali, A. MicroRNA-based therapeutics in cardiovascular disease: Screening and delivery to the target. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 11–21. [\[CrossRef\]](#)
11. Kalayinia, S.; Arjmand, F.; Maleki, M.; Malakootian, M.; Singh, C.P. MicroRNAs: Roles in cardiovascular development and disease. *Cardiovasc. Pathol.* **2021**, *50*, 107296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Costa, M.C.; Kurc, S.; Drożdż, A.; Cortez-Dias, N.; Enguita, F.J. The circulating non-coding RNA landscape for biomarker research: Lessons and prospects from cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 1085–1099. [\[CrossRef\]](#)
13. Lu, D.; Thum, T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2019**, *16*, 661–674. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Huang, C.K.; Kafert-Kasting, S.; Thum, T. Preclinical and Clinical Development of Noncoding RNA Therapeutics for Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 663–678. [\[CrossRef\]](#)
15. Sodi, R.; Eastwood, J.; Caslake, M.; Packard, C.J.; Denby, L. Relationship between circulating microRNA-30c with total- and LDL-cholesterol, their circulatory transportation and effect of statins. *Clin. Chim. Acta.* **2017**, *466*, 13–19. [\[CrossRef\]](#)
16. Zambrano, T.; Hirata, R.; Hirata, M.H.; Cerda, Á.; Salazar, L.A. Statins differentially modulate microRNAs expression in peripheral cells of hyperlipidemic subjects: A pilot study. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *117*, 55–61. [\[CrossRef\]](#)
17. Stormo, C.; Kringen, M.K.; Lyle, R.; Olstad, O.K.; Sachse, D.; Berg, J.P.; Piehler, A.P. RNA-sequencing analysis of HepG2 cells treated with atorvastatin. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e105836. [\[CrossRef\]](#)
18. Cerda, A.; Bortolin, R.H.; Manriquez, V.; Salazar, L.; Zambrano, T.; Fajardo, C.M.; Hirata, M.H.; Hirata, R. Effect of statins on lipid metabolism-related microRNA expression in HepG2 cells. *Pharmacol. Rep.* **2021**, *73*, 868–880. [\[CrossRef\]](#)
19. Lee, S.; Dong, H.H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J. Endocrinol.* **2017**, *233*, R67–R79. [\[CrossRef\]](#)
20. Mallinson, J.E.; Constantin-Teodosiu, D.; Sidaway, J.; Westwood, F.R.; Greenhaff, P.L. Blunted Akt/FOXO signalling and activation of genes controlling atrophy and fuel use in statin myopathy. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 219–230. [\[CrossRef\]](#)
21. Naderi, S.H.; Bestwick, J.P.; Wald, D.S. Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: Meta-analysis on 376,162 patients. *Am. J. Med.* **2012**, *125*, 882–887.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Vinci, P.; Panizon, E.; Tosoni, L.M.; Cerrato, C.; Pellicori, F.; Mearelli, F.; Biasinutto, C.; Fiotti, N.; Di Girolamo, F.G.; Biolo, G. Statin-Associated Myopathy: Emphasis on Mechanisms and Targeted Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Turner, R.M.; Yin, P.; Hanson, A.; FitzGerald, R.; Morris, A.P.; Stables, R.H.; Jorgensen, A.L.; Pirmohamed, M.J. Investigating the prevalence, predictors, and prognosis of suboptimal statin use early after a non-ST elevation acute coronary syndrome. *Clin. Lipidol.* **2017**, *11*, 204–214. [\[CrossRef\]](#)
24. Alonso, R.; Cuevas, A.; Cafferata, A. Diagnosis and Management of Statin Intolerance. *J. Atheroscler. Thromb.* **2019**, *26*, 207–215. [\[CrossRef\]](#)
25. Parker, B.A.; Capizzi, J.A.; Grimaldi, A.S.; Clarkson, P.M.; Cole, S.M.; Keadle, J.; Chipkin, S.; Pescatello, L.S.; Simpson, K.; White, C.M.; et al. Effect of statins on skeletal muscle function. *Circulation* **2013**, *127*, 96–103. [\[CrossRef\]](#)

26. Colantonio, L.D.; Kent, S.T.; Huang, L.; Chen, L.; Monda, K.L.; Serban, M.C.; Manthripragada, A.; Kilgore, M.L.; Rosenson, R.S.; Muntner, P. Algorithms to identify statin intolerance in Medicare administrative claim data. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2016**, *30*, 525–533. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Mancini, G.B.; Baker, S.; Bergeron, J.; Fitchett, D.; Frohlich, J.; Genest, J.; Gupta, M.; Hegele, R.A.; Ng, D.; Pearson, G.J.; et al. Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update. *Can. J. Cardiol.* **2016**, *32*, S35–S65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Leal, K.; Saavedra, K.; Rebolledo, C.; Salazar, L.A. MicroRNAs hsa-miR-618 and hsa-miR-297 Might Modulate the Pleiotropic Effects Exerted by Statins in Endothelial Cells through the Inhibition of ROCK2 Kinase: In-silico Approach. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 704175. [\[CrossRef\]](#)
29. Rauci, A.; Maci, F.; Castiglione, S.; Badi, I.; Vinci, M.C.; Zuccolo, E. MicroRNA-34a: The bad guy in age-related vascular diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 7355–7378. [\[CrossRef\]](#)
30. Hirota, T.; Fujita, Y.; Ieiri, I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2020**, *16*, 809–822. [\[CrossRef\]](#)
31. Mohammadzadeh, N.; Montecucco, F.; Carbone, F.; Xu, S.; Al-Rasadi, K.; Sahebkar, A. Statins: Epidrugs with effects on endothelial health? *Eur. J. Clin. Investig.* **2020**, *50*, e13388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Mitchell, C.J.; D'Souza, R.F.; Schierding, W.; Zeng, N.; Ramzan, F.; O'Sullivan, J.M.; Poppitt, S.D.; Cameron-Smith, D. Identification of human skeletal muscle miRNA related to strength by high-throughput sequencing. *Physiol. Genom.* **2018**, *50*, 416–424. [\[CrossRef\]](#)
33. Liu, D.; Black, B.L.; Derynck, R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes. Dev.* **2001**, *15*, 2950–2966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Fiorillo, A.A.; Heier, C.R.; Huang, Y.F.; Tully, C.B.; Punga, T.; Punga, A.R. Estrogen Receptor, Inflammatory, and FOXO Transcription Factors Regulate Expression of Myasthenia Gravis-Associated Circulating microRNAs. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Du, L.; Xu, Z.; Wang, X.; Liu, F. Integrated bioinformatics analysis identifies microRNA-376a-3p as a new microRNA biomarker in patient with coronary artery disease. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 633–648. [\[PubMed\]](#)
36. Min, P.K.; Park, J.; Isaacs, S.; Taylor, B.A.; Thompson, P.D.; Troyanos, C.; D'Hemecourt, P.; Dyer, S.; Chan, S.Y.; Baggish, A.L. Influence of statins on distinct circulating microRNAs during prolonged aerobic exercise. *J. Appl. Physiol.* **2016**, *120*, 711–720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Siracusa, J.; Koulmann, N.; Sourdille, A.; Chapus, C.; Verret, C.; Bourdon, S.; Goriot, M.E.; Banzet, S. Phenotype-Specific Response of Circulating miRNAs Provides New Biomarkers of Slow or Fast Muscle Damage. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 684. [\[CrossRef\]](#)
38. Fu, C.N.; Song, J.W.; Song, Z.P.; Wang, Q.W.; Bai, W.W.; Guo, T.; Li, P.; Liu, C.; Wang, S.X.; Dong, B. Excessive expression of miR-1a by statin causes skeletal injury through targeting mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1. *Aging* **2021**, *13*, 11470–11490. [\[CrossRef\]](#)
39. Bouitbir, J.; Daussin, F.; Charles, A.L.; Rasseneur, L.; Dufour, S.; Richard, R.; Piquard, F.; Geny, B.; Zoll, J. Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle. Nerve.* **2012**, *46*, 367–373. [\[CrossRef\]](#)
40. Lotteau, S.; Ivarsson, N.; Yang, Z.; Restagno, D.; Colyer, J.; Hopkins, P.; Weightman, A.; Himori, K.; Yamada, T.; Bruton, J.; et al. A Mechanism for Statin-Induced Susceptibility to Myopathy. *JACC Basic Transl. Sci.* **2019**, *4*, 509–523. [\[CrossRef\]](#)
41. Liu, L.; Cao, P.; Zhang, L.; Qi, M.; Wang, L.; Li, Z.; Shao, G.; Ding, L.; Zhao, X.; Zhao, X.; et al. Comparisons of adipogenesis- and lipid metabolism-related gene expression levels in muscle, adipose tissue and liver from Wagyu-cross and Holstein steers. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0247559. [\[CrossRef\]](#)
42. Bai, W.; Ren, M.; Cheng, W.; Lu, X.; Liu, D.; Wang, B. Qindan Capsule Attenuates Myocardial Hypertrophy and Fibrosis in Pressure Overload-Induced Mice Involving mTOR and TGF-β1/Smad Signaling Pathway Inhibition. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2021**, *2021*, 5577875. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Oyabu, M.; Takigawa, K.; Mizutani, S.; Hatazawa, Y.; Fujita, M.; Ohira, Y.; Sugimoto, T.; Suzuki, O.; Tsuchiya, K.; Suganami, T.; et al. FOXO1 cooperates with C/EBPδ and ATF4 to regulate skeletal muscle atrophy transcriptional program during fasting. *FASEB J.* **2022**, *36*, e22152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Hillege, M.; Shi, A.; Galli, R.A.; Wu, G.; Bertolino, P.; Hoogaars, W.; Jaspers, R.T. Lack of Tgfb1 and Acvr1b synergistically stimulates myofibre hypertrophy and accelerates muscle regeneration. *Elife* **2022**, *11*, e77610. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Burks, T.N.; Cohn, R.D. Role of TGF-beta signalling in inherited and acquired myopathies. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 19. [\[CrossRef\]](#)
46. Forbes, K.; Shah, V.K.; Siddals, K.; Gibson, J.M.; Aplin, J.; Westwood, M. Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation. *Mol. Hum. Reprod.* **2015**, *21*, 105–114. [\[CrossRef\]](#)
47. Jang, H.J.; Hong, E.M.; Park, S.W.; Byun, H.W.; Koh, D.H.; Choi, M.H.; Kae, S.H.; Lee, J. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 250–256. [\[CrossRef\]](#)
48. Nordstrand, A.; Lundholm, M.; Larsson, A.; Lerner, U.H.; Widmark, A.; Wikström, P. Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor enhances effects of simvastatin on prostate cancer cells in co-culture with bone. *Cancer Microenviron.* **2013**, *6*, 231–240. [\[CrossRef\]](#)
49. Bonifacio, A.; Sanvee, G.M.; Bouitbir, J.; Krähenbühl, S. The AKT/mTOR signaling pathway plays a key role in statin-induced myotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1853*, 1841–1849. [\[CrossRef\]](#)

50. Zhang, H.; Chi, M.; Chen, L.; Sun, X.; Wan, L.; Yang, Q.; Guo, C. Linalool Prevents Cisplatin Induced Muscle Atrophy by Regulating IGF-1/Akt/FoxO Pathway. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 598166. [\[CrossRef\]](#)
51. Apostolopoulou, M.; Corsini, A.; Roden, M. The role of mitochondria in statin-induced myopathy. *Eur. J. Clin. Investig.* **2015**, *45*, 745–754. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Auer, J.; Sinzinger, H.; Franklin, B.; Berent, R. Muscle- and skeletal-related side-effects of statins: Tip of the iceberg? *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2016**, *23*, 88–110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Mollazadeh, H.; Tavana, E.; Fanni, G.; Bo, S.; Banach, M.; Pirro, M.; von Haehling, S.; Jamialahmadi, T.; Sahebkar, A. Effects of statins on mitochondrial pathways. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2021**, *12*, 237–251. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Verbeek, R.; Hovingh, G.K.; Boekholdt, S.M. Non-high-density lipoprotein cholesterol: Current status as cardiovascular marker. *Curr. Opin. Lipidol.* **2015**, *26*, 502–510. [\[CrossRef\]](#)
55. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: New models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 2439–2454. [\[CrossRef\]](#)
56. SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2-OP risk prediction algorithms: Estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur. Heart J.* **2021**, *42*, 2455–2467. [\[CrossRef\]](#)
57. Ference, B.A.; Majeed, F.; Penumetcha, R.; Flack, J.M.; Brook, R.D. Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: A 2×2 factorial Mendelian randomization study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2015**, *65*, 1552–1561. [\[CrossRef\]](#)
58. Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Ørntoft, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250. [\[CrossRef\]](#)
59. Belmonte, T.; Mangas, A.; Calderon-Dominguez, M.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos, M.; Campuzano, O.; Gomez, S.; Peña, M.L.; Cubillos-Arango, A.M.; Dominguez, F.; et al. Peripheral microRNA panels to guide the diagnosis of familial cardiomyopathy. *Transl. Res.* **2020**, *218*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
60. Mi, H.; Muruganujan, A.; Ebert, D.; Huang, X.; Thomas, P.D. PANTHER version 14: More genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D419–D426. [\[CrossRef\]](#)
61. Clum, A.; Huntemann, M.; Bushnell, B.; Foster, B.; Foster, B.; Roux, S.; Hajek, P.P.; Varghese, N.; Mukherjee, S.; Reddy, T.; et al. DOE JGI Metagenome Workflow. *Msystems* **2021**, *6*, e00804–e00820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Szklarczyk, D.; Gable, A.L.; Lyon, D.; Junge, A.; Wyder, S.; Huerta-Cepas, J.; Simonovic, M.; Doncheva, N.T.; Morris, J.H.; Bork, P.; et al. STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D607–D613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Liao, Y.; Wang, J.; Jaehnig, E.J.; Shi, Z.; Zhang, B. WebGestalt 2019: Gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W199–W205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Motulsky, H.J.; Brown, R.E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression—A new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinform.* **2006**, *7*, 123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

17.2 ARTÍCULO 2.

LA SUPRESIÓN DE MIR-16-5P PROTEGE A LOS CARDIOMIOCITOS HUMANOS CONTRA LA LESIÓN INDUCIDA POR EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO



Article

miR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury

Rocío Toro ^{1,2,*}, Alexandra Pérez-Serra ^{3,4,†}, Alipio Mangas ^{1,5}, Oscar Campuzano ^{4,6,7}, Georgia Sarquella-Brugada ^{7,8}, Maribel Quezada-Feijoo ⁹, Mónica Ramos ⁹, Martín Alcalá ¹⁰, Esther Carrera ¹⁰, Carlos García-Padilla ¹¹, Diego Franco ^{12,13} and Fernando Bonet ^{1,2,*}



Citation: 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. <https://doi.org/10.3390/ijms23031036>

Academic Editors: Raquel Del Toro and Tarik Smani

Received: 2 December 2021

Accepted: 15 January 2022

Published: 18 January 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 Medicine Department, School of Medicine, University of Cádiz (UCA), 11003 Cádiz, Spain; alipio.mangas@uca.es
 - ² Research Unit, Biomedical Research and Innovation Institute of Cadiz (INIBICA), Puerta del Mar University Hospital, 11009 Cadiz, Spain
 - ³ Cardiology Service, Hospital Josep Trueta, University of Girona, 17007 Girona, Spain; aperez@gencardio.com
 - ⁴ Cardiovascular Genetics Center, University of Girona-IDIBGI, 17190 Girona, Spain; oscar@brugada.org
 - ⁵ Internal Medicine Department, Puerta del Mar University Hospital, School of Medicine, University of Cadiz, 11009 Cadiz, Spain
 - ⁶ Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain
 - ⁷ Medical Science Department, School of Medicine, University of Girona, 17003 Girona, Spain; georgia@brugada.org
 - ⁸ Arrhythmias Unit, Hospital Sant Joan de Déu, University of Barcelona, 08950 Barcelona, Spain
 - ⁹ Cardiology Department Hospital Cruz Roja, Alfonso X University, 28003 Madrid, Spain; maribelquezada2000@gmail.com (M.Q.-F.); monica.ramos81@gmail.com (M.R.)
 - ¹⁰ Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo, CEU Universities, 28668 Madrid, Spain; martin.alcaladiazmor@ceu.es (M.A.); escarrera@ceu.es (E.C.)
 - ¹¹ Departamento de Anatomía, Embriología y Zoología, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz, Spain; cgp00013@red.ujae.es
 - ¹² Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, Spain; dfranco@ujaen.es
 - ¹³ Medina Foundation, Technology Park of Health Sciences, 18016 Granada, Spain
- * Correspondence: rocio.toro@uca.es (R.T.); fbonetmartinez@gmail.com (F.B.)
† Co-first author, these authors contributed equally to this work.

Abstract: Oxidative stress, defined as the excess production of reactive oxygen species (ROS) relative to antioxidant defense, plays a significant role in the development of cardiovascular diseases. Endoplasmic reticulum (ER) stress has emerged as an important source of ROS and its modulation could be cardioprotective. Previously, we demonstrated that miR-16-5p is enriched in the plasma of ischemic dilated cardiomyopathy (ICM) patients and promotes ER stress-induced apoptosis in cardiomyocytes in vitro. Here, we hypothesize that miR-16-5p might contribute to oxidative stress through ER stress induction and that targeting miR-16-5p may exert a cardioprotective role in ER stress-mediated cardiac injury. Analysis of oxidative markers in the plasma of ICM patients demonstrates that oxidative stress is associated with ICM. Moreover, we confirm that miR-16-5p overexpression promotes oxidative stress in AC16 cardiomyoblasts. We also find that, in response to tunicamycin-induced ER stress, miR-16-5p suppression decreases apoptosis, inflammation and cardiac damage via activating the ATF6-mediated cytoprotective pathway. Finally, ATF6 is identified as a direct target gene of miR-16-5p by dual-luciferase reporter assays. Our results indicate that miR-16-5p promotes ER stress and oxidative stress in cardiac cells through regulating ATF6, suggesting that the inhibition of miR-16-5p has potential as a therapeutic approach to protect the heart against ER and oxidative stress-induced injury.

Keywords: miR-16-5p; ischemic dilated cardiomyopathy; reactive oxygen species; endoplasmic reticulum stress; ATF6

1. Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the most common causes of heart failure (HF) and is associated with significant morbidity and mortality. From a pathophysiology perspective, DCM involves ventricular chamber enlargement and systolic dysfunction with an ejection fraction of <50% [1]. Ischemic DCM (ICM) is the most prevalent cause of DCM and leads to malignant arrhythmias and HF and is thus considered one of the most common causes of heart transplantation [2,3].

Decades of research have provided substantial evidence that oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of cardiac remodeling and HF [4–10]. Furthermore, oxidative stress has been associated with DCM both in human and animal models [11–14]. Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to the disruption of redox signaling and control and/or molecular damage [15]. In the heart, reactive oxygen species (ROS) play a critical role in controlling cell homeostasis in cardiomyocytes since they act as second messengers in different cellular pathways. However, ROS overproduction can become extremely dangerous to proteins, membranes, and nucleic acids, and is linked to multiple pathophysiological pathways in the heart. Protective mechanisms balancing the dangerous effects of ROS include the scavenging activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) [16–18].

Recent findings suggest that endoplasmic reticulum (ER) stress is intimately related to ROS production in animals [19–21]. Furthermore, in the last decade, ER stress has been associated with several cardiac diseases, including ischemia, DCM, and HF [22,23]. The ER coordinates the synthesis, folding, and quality control of almost all secreted and membrane proteins. Alteration in ER homeostasis causes the accumulation of unfolded and misfolded proteins in the ER lumen, leading to ER stress [24]. When ER stress occurs, the unfolded protein response (UPR) is activated to re-establish cellular proteostasis. UPR is initiated by the activation of three signaling branches, namely inositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α), protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6), which culminates in the attenuation of protein synthesis and a transcriptional response aimed at coping with the accumulation of unfolded proteins [25,26]. In normal conditions, the three transducers are kept inactive through the chaperone binding protein/78 kDa glucose-regulated protein (GRP78). In stressed conditions, GRP78 dissociates from IRE1 α , PERK, and ATF6 and allows UPR activation [26]. Since protein folding is linked to ROS formation, the increment in folding load during ER stress strongly induces ROS production and exacerbates oxidative stress [27]. The activation of UPR can moderate ROS production by reducing the folding demand but also by the activation of genes encoding antioxidant enzymes [28,29]. Nevertheless, if the stress is severe or chronic, UPR assumes an adverse role and triggers apoptosis [30,31].

MicroRNAs (miRNAs) are a class of noncoding single-stranded RNA molecules with 22 nucleotides that regulate gene expression post-transcriptionally [32–34]. Besides their well-known role in many cardiovascular diseases and biological processes [35–39], miRNAs have emerged as key regulators of the ER stress response and important players in ER UPR-dependent signaling in the heart [40]. Additionally, miRNAs have been identified as potential biomarkers of DCM, cardiac remodeling, and HF [41,42]. In this context, we have previously demonstrated that miR-16-5p is upregulated in the plasma of ICM patients [43]. Our *in vitro* studies showed that miR-16-5p promotes ER stress-induced apoptosis, autophagy, and inflammation in human ventricular myocytes [43]. In the present study, we hypothesize that miR-16-5p might contribute to oxidative stress through ER stress induction and that targeting miR-16-5p may exert a cardioprotective role in ER stress-mediated cardiac injury. The contribution of miR-16-5p-mediated ER stress to ROS production, as well as the ability of miR-16-5p inhibition to counteract ER-stress induced cardiac injury, is tested *in vitro* in the human cardiomyocyte cell line AC16. The modulation of the UPR pathway in miR-16-5p-mediated ER stress is also investigated.

2. Results

2.1. Patients and Control Subjects

The baseline characteristics of the study population are presented in Table 1. There were no statistically significant differences in gender. As expected, the ICM group exhibited an increase in left atrial dimension and E/e' ratio, compared with the control group ($p < 0.001$). Mitral annular plane systolic excursion was significantly reduced in the ICM group ($p < 0.001$) and no significant differences were observed in tricuspid annular plane systolic excursion. Both mitral and tricuspid insufficiency were only detected in ICM patients. Finally, confirming the results from our previous work [43], expression levels of miR-16-5p were increased in the plasma of ICM patients.

Table 1. Baseline characteristics of patients with ICM and controls.

Variable	Healthy Control ($n = 12$)	Ischemic DCM ($n = 12$)	p -Value
Age (years) ^a , means $\pm$ SD	45.2 $\pm$ 14.4	63.0 $\pm$ 8.8	0.006
Sex (male)	62.5%	66.7%	ns
BMI (Kg/m ²) ^a , means $\pm$ SD	22.9 $\pm$ 3.51	29.0 $\pm$ 2.9	0.003
LVEF (%) ^a , means $\pm$ SD	68.5 $\pm$ 6.05	34.0 $\pm$ 5.8	<0.001
LVEDD (mm) ^b , means $\pm$ SD	45.7 $\pm$ 5.3	61.7 $\pm$ 6.5	<0.001
LVESD (mm) ^a , means $\pm$ SD	28.0 $\pm$ 4.2	46.2 $\pm$ 15.5	0.004
LA (mm) ^a , means $\pm$ SD	36.6 $\pm$ 6.9	47.2 $\pm$ 5.9	0.002
Sphericity index ^a , means $\pm$ SD	0.6 $\pm$ 0.03	0.7 $\pm$ 0.04	0.03
TAPSE (mm) ^a , means $\pm$ SD	19.09 $\pm$ 4.37	21.44 $\pm$ 4.21	ns
MAPSE (mm) ^a , means $\pm$ SD	18.77 $\pm$ 2.88	10.98 $\pm$ 2.24	<0.001
MI	-	10 (83.4%)	0.001
TI	-	6 (50%)	0.02
E/e' ratio ^b , means $\pm$ SD	7.59 $\pm$ 1.59	18.12 $\pm$ 7.62	<0.001
NYHA class	I	II	<0.001
miR-16-5p expression levels (log ₂) ^a	7.522 $\pm$ 0.43	8.232 $\pm$ 0.52	0.005

BMI, body mass index; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LA, left atrial dimension; MI, mitral insufficiency; TI, tricuspid insufficiency; E/e', ratio of mitral early diastolic flow velocity over tissue Doppler lateral mitral annular lengthening velocity; NYHA, New York Heart Association; ns: nonsignificant. ^a Student's t test; ^b Mann-Whitney U test.

2.2. Increased Oxidative Stress in Plasma from ICM Patients

Oxidative stress has been demonstrated to be elevated in plasma from patients with ischemic heart disease and non-ischemic DCM [44,45]. We therefore assessed the oxidative stress status in ICM patients by the quantitative examination of malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation protein products (AOPPs). As shown in Figure 1A,B, the levels of MDA and AOPP in the plasma of ICM patients were increased as compared to controls. In addition, the activity of antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, and reduced glutathione (GSH) were decreased in the plasma of ICM patients as compared to the control cohort (Figure 1C–F). These results confirm that oxidative stress is increased in plasma from ICM patients.

2.3. miR-16-5p Overexpression Induces Oxidative Stress in Human Cardiomyoblasts

Since ER stress is closely linked to ROS generation, contributing to oxidative stress [27], we next analyzed whether miR-16-5p-induced ER stress causes oxidative stress in AC16 cells. For this purpose, we first measured AOPP and MDA levels as markers of oxidative stress in AC16 cells treated with miR-16-5p mimic. As shown in Figure 2A, AOPP levels were higher in AC16 cells after miR-16-5p overexpression than in control conditions, whereas MDA levels remained unaltered (Figure 2B). Additionally, qPCR analysis showed that miR-16-5p significantly downregulated the expression of antioxidant genes *CAT*, *SOD1*, and *GPX* in AC16 cells (Figure 2C). In agreement, western blot analysis also showed a significant decrease in CAT and GPx1 protein levels in AC16 cells transfected with miR-16-5p mimic over controls (Figure 2D,E). These data indicate that miR-16-5p promotes oxidative stress in human cardiomyoblasts.

2.4. Effect of miR-16-5p on Mitochondrial Respiration in Cultured Human Cardiomyoblasts

Mitochondria, especially abundant in the heart, are the major site of ROS production, and impairment of their function leads to the excessive production of ROS, contributing to cardiac pathology [46]. The acute induction of ER stress leads to mitochondrial dysfunction, enhancing ROS production in the heart [47]. Therefore, we next investigated the impact of miR-16-5p-induced ER stress on mitochondrial respiration by measuring the oxygen consumption rates of mitochondria (OCR). Overexpression of miR-16-5p induced a significant decrement in overall mitochondrial respiration as AC16 cells showed a substantial decrease in OCR after miR-16-5p transfection (Figure 3A–F). Quantification of OCR parameters determined that miR-16-5p appears to attenuate basal respiration (Figure 3B), ATP-synthesis-coupled respiration (Figure 3C), proton (H^+) leak (Figure 3D), maximal respiratory capacity (Figure 3E), and reserve capacity (Figure 3F) in AC16 cells. These results indicate that miR-16-5p promotes mitochondrial dysfunction in human cardiomyoblasts.

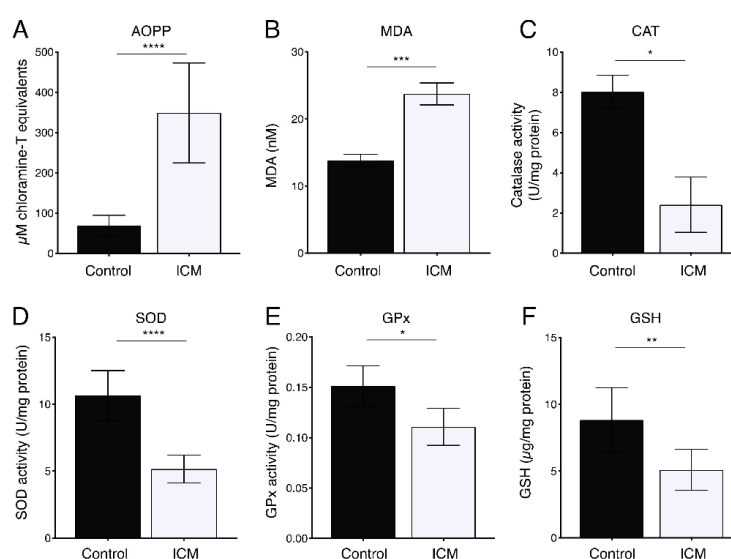


Figure 1. Plasma levels of oxidative stress biomarkers in patients with ICM. (A,B) MDA and AOPP levels in ICM patients ($n = 12$) are significantly higher than those in controls ($n = 12$). (C–F) Activity of the antioxidant enzymes (C) CAT, (D) SOD, (E) GPx, and (F) GSH is lower in ICM patients than in controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$.

2.5. miR-16-5p Suppression Promotes the Cytoprotective Role of ER Stress in Human Cardiomyoblasts

Based on our previous work [43], we aimed to investigate whether miR-16-5p inhibition may exert a cardioprotective role against ER stress-induced injury. For this purpose, AC16 cells were treated with the ER stressor tunicamycin (TN). TN treatment provoked ER stress in AC16 cells, as demonstrated by the upregulation of GRP78 (Figure 4A). However, the expression of markers of the IRE1 α (XBP1) and PERK (CHOP) pathways were increased by TN, whereas ATF6 was downregulated (Figure 4A). miR-16-5p inhibition reverted the TN-induced ATF6 downregulation (Figure 4A). In contrast, upregulation of XBP1 and CHOP was exacerbated by miR-16-5p deficiency (Figure 4A). Interestingly, TN also stimulated miR-16-5p expression, corroborating the data obtained in vivo (Figure 4B).

ATF6 activates the expression levels of genes encoding antioxidant proteins in cardiomyocytes [29]. Therefore, we evaluated the effect of miR-16-5p inhibition on the expression of antioxidant genes in the context of cardiac ER stress. TN treatment only significantly

altered *SOD1* expression levels but not *CAT* (Figure 4C). However, when miR-16-5p was inhibited, both *CAT* and *SOD1* expression levels were significantly upregulated (Figure 4C).

Next, we evaluated the protective effect of miR-16-5p inhibition against ER stress-induced cardiomyocyte apoptosis by assessing the activation of caspase-3 and -7 using the FLICA assay. As expected, exposure to TN resulted in a significant increase in ER stress-induced apoptosis in AC16 cells. However, miR-16-5p suppression reversed the apoptosis in response to TN (Figure 4D,E). Consistently, miR-16-5p inhibition rescued impaired antiapoptotic *BCL-2* expression in AC16 cells treated with TN (Figure 4F). On the other hand, TN decreased the expression levels of *ATG14*, a key player in regulating autophagy, but this effect was rescued when miR-16-5p was inhibited (Figure 4G).

Finally, we examined the effect of miR-16-5p disruption on cardiac damage in the context of TN-induced ER stress. The inflammatory mediator *IL-6* and the cardiac injury marker cardiac troponin T (*TNNT2*) were upregulated in AC16 cells treated with TN. However, miR-16-5p inhibition significantly downregulated their expression (Figure 4H). Collectively, these results indicate that miR-16-5p suppression has a protective role against ER stress-induced cardiomyocyte damage.

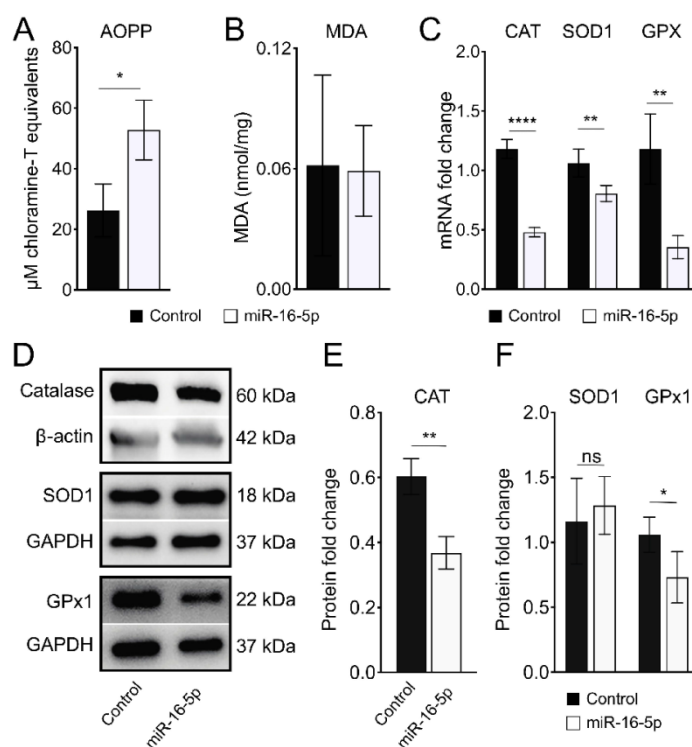


Figure 2. miR-16-5p overexpression causes oxidative stress in cardiomyoblasts in vitro. (A) AOPP determination shows increased levels in AC16 cells after miR-16-5p overexpression ($n = 6$). (B) The levels of MDA content are unaltered in miR-16-5p-overexpressing AC16 cells ($n = 6$). (C) qPCR analysis shows reduced expression levels of the antioxidant genes *CAT*, *SOD1*, and *GPX* in AC16 cells after miR-16-5p overexpression ($n = 6$). (D) Representative western blots of *CAT*, *SOD1*, and *GPx1* in AC16 cells after miR-16-5p overexpression. (E,F) Densitometry analysis of western blots show reduced levels of (E) *CAT* ($n = 5$) and (F) *GPx1* ($n = 4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, ns: nonsignificant.

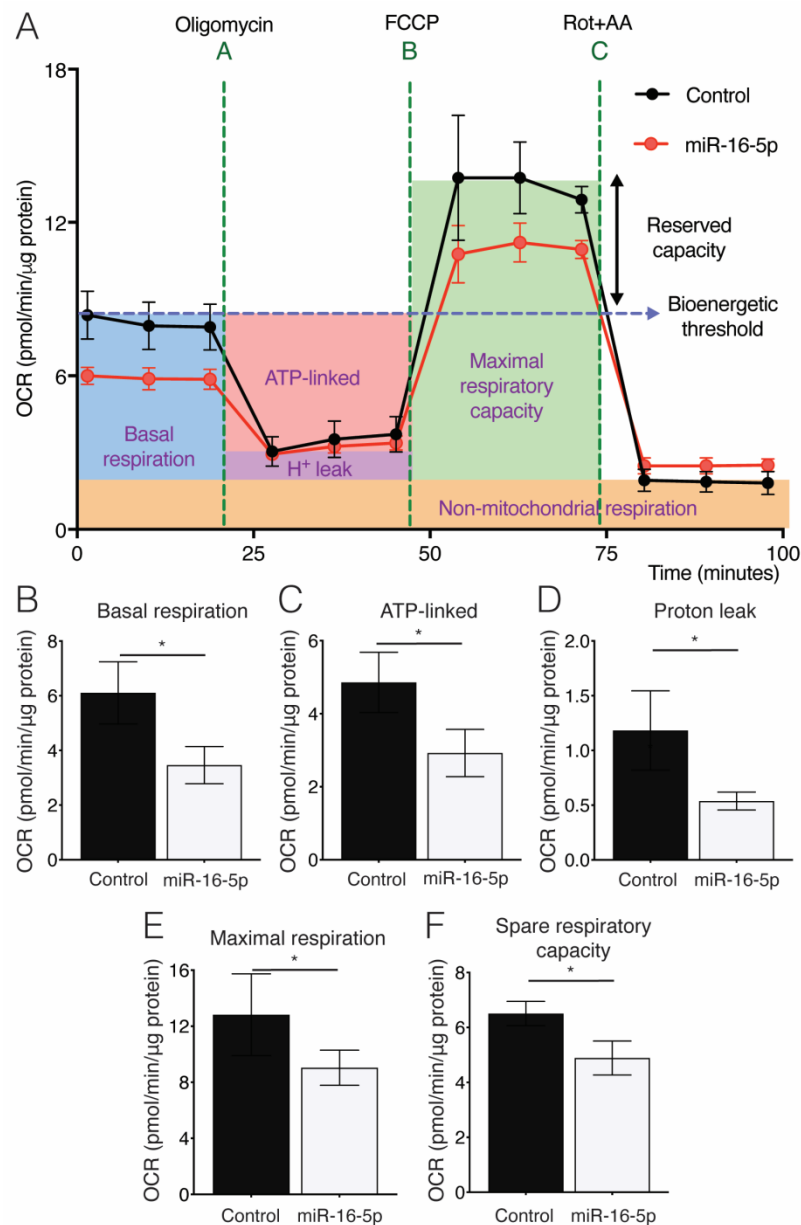


Figure 3. miR-16-5p overexpression leads to mitochondrial dysfunction in AC16 cells: Seahorse Cell Mito Stress Test to measure OCR in AC16 cells 24 h following miR-16-5p overexpression ($n = 4$). (A) OCR profile plot. (B) Basal respiration, (C) ATP-linked, (D) proton leak, (E) maximal respiration, and (F) spare respiratory capacity are reduced in AC16 cells after miR-16-5p overexpression. $* p < 0.05$. FCCP, Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; ROT, inhibitor rotenone; AA, antimycin A.

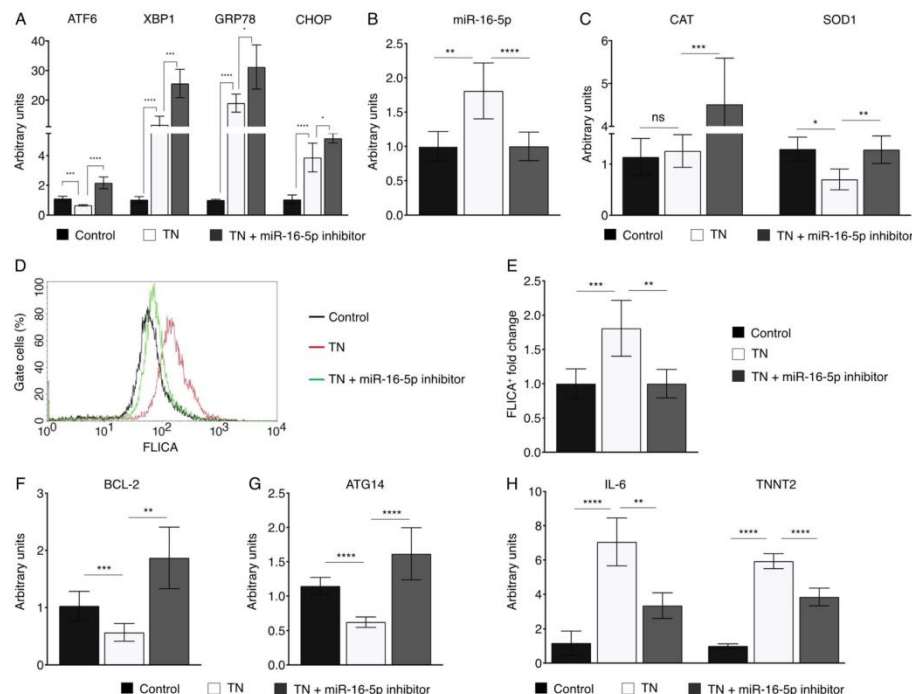


Figure 4. miR-16-5p inhibition reverts the damage caused by TN-induced ER stress in cardiomyoblasts. (A) qPCR analysis of *ATF6*, *XBP1*, *GRP78*, and *CHOP* expression in control ($n = 5$), TN-treated ($n = 6$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 6$) AC16 cells. (B) qPCR analysis of miR-16-5p expression in control ($n = 5$), TN-treated ($n = 6$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 5$) AC16 cells. (C) qPCR analysis of *CAT* and *SOD1* in control ($n = 6$), TN-treated ($n = 6$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 6$) AC16 cells. (D) Representative FLICA staining of AC16 cells 6 h after TN or TN plus miR-16-5p inhibitor treatment as compared to control. The numbers in the gated regions are FLICA⁺ AC16 cells (%). (E) Summary of D of control ($n = 8$), TN-treated ($n = 8$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 8$) AC16 cells analyzed using the FLICA Poly Caspase Assay kit. (F,G) qPCR analysis of *BCL-2* and *ATG14* expression in control ($n = 6$), TN-treated ($n = 6$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 6$) AC16 cells. (H) qPCR analysis of *IL-6* and *TNNT2* expression in control ($n = 6$), TN-treated ($n = 6$), and TN plus miR-16-5p inhibitor-treated ($n = 6$) AC16 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$. TN, Tunicamycin.

2.6. miR-16-5p Directly Targets ATF6

To explore the underlying mechanism by which miR-16-5p regulates ER stress, we investigated the target of miR-16-5p, which might modulate the UPR signaling pathway. By the prediction of new targets of miR-16-5p via TargetScan 7.2 (http://www.targetscan.org/vert_72/ accessed on 1 December 2021), we found that the 3'UTR region of human *ATF6* contained two putative miR-16-5p target sites (Figure 5A), one highly conserved (hereafter called ATF6 3'UTR₁) and another poorly conserved across different species (hereafter called ATF6 3'UTR₂) (data not shown). To verify this prediction, we performed a dual-luciferase reporter assay. The pMIR-REPORT containing the ATF6 3'UTR₁ or ATF6 3'UTR₂ was co-transfected with miR-16-5p mimics into 3T3 cells, respectively. The results showed that miR-16-5p significantly reduced the luciferase activity of the pMIR-REPORT vector containing the ATF6 3'UTR₁, whereas the luciferase activity of the pMIR-REPORT

vector containing the ATF6 3'UTR_2 was unaltered (Figure 5B). These results confirmed that *ATF6* is a direct target gene of miR-16-5p.

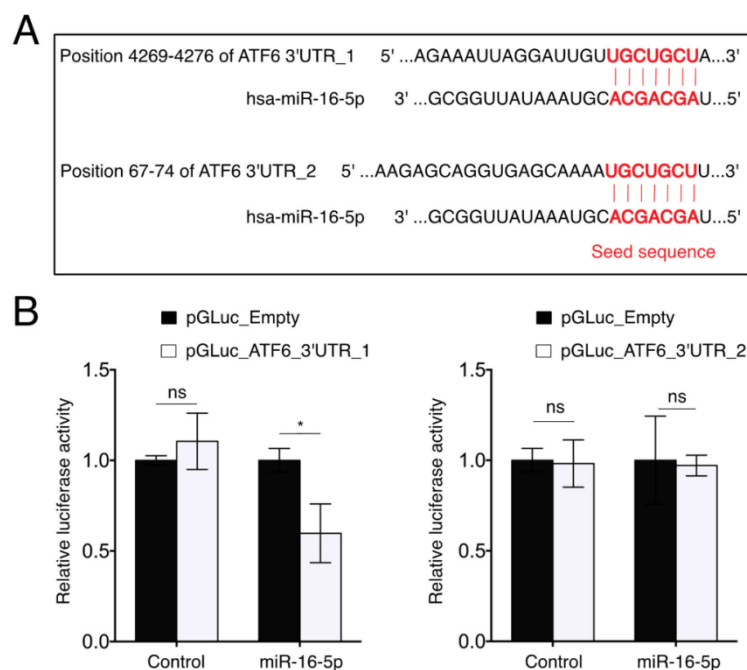


Figure 5. miR-16-5p targets ATF6. (A) Predicted miR-16-5p binding sites in the 3'UTR of ATF6. (B) Dual-luciferase activity assay in 3T3 cells co-transfected with the pMIR-REPORT miRNA expression reporter vector containing the ATF6 3'UTR_1 or ATF6 3'UTR_2 fragment with miR-16-5p mimic for 18 h ($n = 3$). * $p < 0.05$. ns: nonsignificant.

3. Discussion

In the present study, we provide evidence that miR-16-5p mediates the crosstalk between ER stress and oxidative stress in ICM. In this context, we identify miR-16-5p as a crucial regulator of the ATF6-mediated cytoprotective response upon ER stress activation in AC16 cells.

The importance of the link between ER stress and oxidative stress in the development of cardiac diseases such as ICM has been well documented [27,29]. In this regard, previous studies have reported elevated levels of the oxidative stress markers AOPP and MDA in ischemic heart diseases [44,45,48]. We first confirmed elevated oxidative stress in the plasma of ICM patients as levels of AOPP and MDA were increased, reinforcing the involvement of oxidative stress in the development of ischemic heart disease. In addition, we observed lower activity of antioxidant enzymes in the plasma of ICM patients. ATF6 is an inducer of numerous antioxidant genes in the heart during ischemia-induced ER stress in cardiomyocytes [29]. We previously reported that miR-16-5p, enriched in the plasma of ICM patients, induces ER stress, decreasing *ATF6* expression in human cardiomyoblasts [41]. Together, our observations suggest that miR-16-5p may play a role in ER stress-related ROS production in the context of ICM, impairing the cytoprotective role of ATF6.

miR-16-5p was previously shown to be upregulated in the ischemic heart [49]. More recently, miR-16-5p was identified to be upregulated in both human and rat ventricular cardiomyocytes after ischemia/reperfusion (I/R) treatment [50,51]. Finally, miR-16 was

upregulated in neonatal rat ventricular cells under oxidative stress induced by hydrogen peroxide [52]. Therefore, we next examined whether miR-16-5p may induce oxidative stress in cardiomyocytes in vitro. We showed that miR-16-5p overexpression resulted in increased levels of AOPP and downregulation of antioxidant genes' expression in human cardiomyocytes. Thus, our data collectively indicate that miR-16-5p promotes both ER stress and oxidative stress, suggesting a link between miR-16-5p-induced ER stress and oxidative stress in cardiomyocytes. Consistently, the role of miRNAs mediating ER stress and oxidative stress during myocardial I/R injury has been already described. In 2016, Ke and colleagues showed that miR-93 protects against I/R-induced ROS generation and ER stress-mediated cardiomyocyte apoptosis [53].

It has been shown that ER stress induces cardiac dysfunction through the alteration of mitochondrial function in cardiomyocytes [54,55]. The fact that ER stress-mediated mitochondrial dysfunction enhances ROS production in the adult heart [46,47] prompted us to investigate whether miR-16-5p overexpression impairs mitochondrial respiration in human cardiomyoblasts. Our results showed that miR-16-5p also promoted mitochondrial dysfunction in AC16 cells, suggesting that miR-16-5p might also exacerbate oxidative stress via ER stress-induced mitochondrial dysfunction in an ICM context.

ATF6 deficiency has been associated with mitochondria function impairment [56]. On the other hand, Jin and colleagues previously reported ATF6 as a link between ER stress and oxidative stress in myocardial ischemia [29]. This study showed that the knockdown of ATF6 in cardiac myocytes subjected to I/R increased ROS and necrotic cell death, and that ATF6 overexpression mitigated these effects. They also observed that knocking out ATF6 in mice increased damage upon I/R, whereas AAV9-mediated ATF6 overexpression restored ATF6 knockout heart function [29]. More recently, Blackwood and colleagues showed that the pharmacological activation of ATF6 improved ER proteostasis and decreased oxidative stress cardiac myocytes in vitro. In addition, intravenous administration of the compound 147 protected the heart from I/R damage in vivo [57]. Concordantly, we show here that ATF6 is a direct target of miR-16-5p and that miR-16-5p inhibition reverted TN-induced ATF6 downregulation in human cardiac cells. Therefore, our observations suggest that miR-16-5p might exacerbate oxidative stress in an ER stress-dependent manner, impairing the ATF6-mediated cytoprotective pathway in human cardiomyocytes.

We next examined whether the inhibition of miR-16-5p may protect human cardiomyoblasts against acute ER stress induced by the ER stressor TN. miR-16-5p loss-of-function rescued the impaired ATF6 expression and upregulated antioxidant genes' expression in TN-treated AC16 cells, promoting the cytoprotective adaptation to ER stress. In contrast, the expression of XBP1, an indicator of IRE1 α activation, was even higher when miR-16-5p was inhibited. Since ATF6 has been shown to bind to the promoter of XBP1, enhancing its expression [58], the upregulation of XBP1 may be due to a combined effect of the ATF6 activation upon miR-16-5p inhibition plus the TN-induced XBP1 expression. A similar scenario was observed in the upregulation of GPR78, whose expression is also regulated by ATF6. This is consistent with previous reports showing that, although the three UPR pathways are often activated together, the selective activation of some pathways together with the suppression of others can occur [59,60]. TN treatment also induced miR-16-5p expression, reinforcing our hypothesis that miR-16-5p may constitute a crucial player mediating the complex crosstalk between ATF6-mediated ER stress and ROS production in the heart. A working model summarizing the role of miR-16-5p in the ER stress and UPR response in the context of ICM is shown in Figure 6. Although TN treatment induced miR-16-5p expression, only SOD1 expression was downregulated. The discrepancy between these results and those observed upon miR-16-5p treatment may be explained by the fact that TN promotes the expression of XBP1, whereas miR-16-5p impairs XBP1 expression [43]. As XBP1 is able to regulate CAT downstream [61], the effect of miR-16-5p on CAT expression might be compensated by XBP1 upregulation. SOD1 expression was rescued by miR-16-5p inhibition, whereas CAT expression was induced, supporting the notion that miR-16-5p might exacerbate oxidative stress, regulating the expression of antioxidant genes through ATF6.

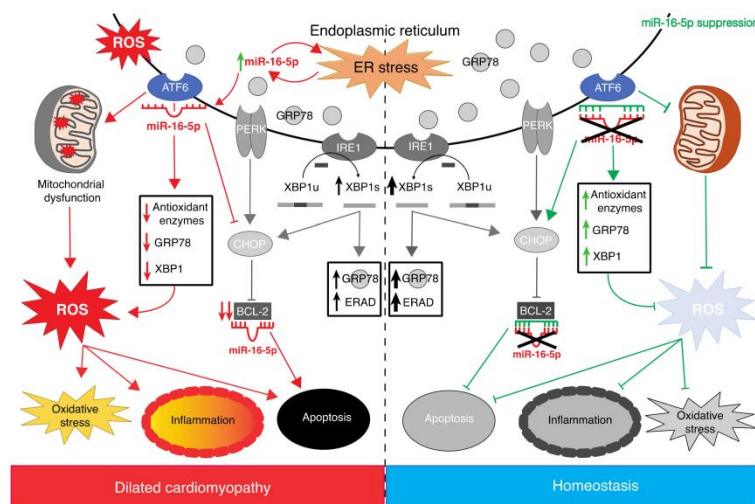


Figure 6. Working model for the role of miR-16-5p in the regulation of the ATF6-mediated UPR signaling in human cardiomyocytes. miR-16-5p inhibits the ER stress-induced cytoprotective response mediated by ATF6, which results in mitochondrial dysfunction and an increase in ROS production, promoting cardiomyocytes' inflammation and apoptosis. miR-16-5p suppression activates the ATF6-mediated cytoprotective response, maintaining cell homeostasis. Arrow symbols indicate the activation pathway or signaling pathway. T symbols indicate nonactivation pathway or signaling pathway.

In addition, miR-16-5p suppression also protected human cardiomyoblasts against ER stress-induced apoptosis. Accordingly, the expression of the antiapoptotic *BCL-2* was reverted by miR-16-5p inhibition in TN-treated AC16 cells. Surprisingly, inhibition of miR-16-5p maximized the TN-induced *CHOP* upregulation, possibly promoted by the upregulation of *ATF6* and *XBP1* upon miR-16-5p inhibition [58]. This is in apparent disagreement with the fact that *CHOP* regulates ER stress-induced apoptosis by decreasing *BCL-2* expression [62]. Nevertheless, *BCL-2* is a direct target of miR-16-5p [63], indicating that *BCL-2* may be also regulated in a *CHOP*-independent manner, as already described [64]. We finally demonstrated that indeed miR-16-5p directly targets *ATF6*, suggesting that the increased survival of miR-16-5p knockdown cardiomyoblasts upon TN treatment may be due to the combined effect of *ATF6* and *BCL-2* gene regulatory changes. Finally, the protective role of miR-16-5p against ER stress-induced injury was confirmed as the expression levels of *IL-6* and *TNNT2*, markers of inflammation and cardiac injury, respectively, were reverted upon miR-16-5p inhibition.

There are limitations to this study. First, the study group was relatively small; however, the included patients were strictly ICM subjects. Second, the lack of heart tissue samples is a common intrinsic feature in clinical human studies. Thus, oxidative stress markers were measured in blood samples, which are the most commonly used in clinical practice. The age of the study population showed significant differences between cohorts, which might have affected the oxidative stress status. However, Pearson correlation analysis shows no correlation between age and miR-16-5p expression in ICM patients ($r = -0.553$; $p = 0.062$), indicating that miR-16-5p expression is not age-dependent. Finally, the present study was based on in vitro experiments, and the effect of miR-16-5p suppression in vivo has not been tested. Finally, studies including a larger sample size would be needed to validate these data.

In conclusion, we demonstrate for the first time that miR-16-5p is a key player in the ATF6-mediated crosstalk between ER stress and oxidative stress through the direct targeting of *ATF6*, and miR-16-5p inhibition protects human cardiomyoblasts against

ER stress and associated damage, inducing the ATF6-mediated cytoprotective response. Therefore, miR-16-5p suppression could emerge as a promising therapeutic strategy to limit the development and progression of ICM associated with ER stress.

4. Materials and Methods

4.1. Study Population and Blood Sampling

This is a case-control study. We recruited twelve healthy controls and twelve ICM patients. Only individuals older than 18 years were included. Complete clinical information, including family and personal history, symptoms of HF, as well as pharmacological information, was acquired from each patient. Transthoracic echocardiogram and electrocardiogram were performed for all individuals. All ICM patients were verified with a coronary artery catheterization, as recommended by the European Society of Cardiology guidelines [65]. ICM was considered if significant stenosis (luminal diameter stenosis $\geq 50\%$ of the left main artery or $\geq 75\%$ of epicardial coronary artery) was present in one or more major coronary arteries. Plasma samples were obtained and processed as previously described [66].

This study was approved by the Ethics Committee of the Puerta del Mar University Hospital, and all patients gave their written informed consent. The ethical research principles were fulfilled following the Helsinki Declaration and the Belmont report. The study also adhered to two legal provisions governing human research and the Spanish Organic Law 15/1999 for the Regulation of Automated Processing of Personal Data.

4.2. Oxidative Damage Determination

We used plasma for the determination of markers of oxidative damage to lipids and proteins after the addition of 5 mM butylated hydroxytoluene as an antioxidant. To measure MDA and AOPP levels, AC16 cells were lysed with 100 μ L of RIPA buffer on ice for 20 min and centrifuged for 30 min at 12,000 rpm. MDA was determined using the thiobarbituric acid reactive substances method [67]. The content of AOPP was measured according to Witko-Sarsat's method, with minor modifications [68].

4.3. Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Systems

CAT-specific activity was measured by monitoring the disappearance of hydrogen peroxide at 240 nm [69]. To measure superoxide dismutase (SOD1) enzymatic activity, we adapted the method described by Bamforth [70]. The glutathione peroxidase (GPx)-specific activity assay is based on the oxidation of glutathione by GPx and measured following the disappearance of NADPH + H⁺ at 340 nm [71]. The main water-soluble, non-enzymatic antioxidant, reduced glutathione (GSH), was measured at pH 8 after the formation of a complex with the fluorescent probe o-phthalaldehyde at an excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 420 nm.

4.4. Cell Culture and Transfection

AC16 cells were maintained in DMEM F12 with 10% fetal bovine serum as well as 1% penicillin/streptomycin, at 37 °C and 5% CO₂. The overexpression of miR-16-5p was performed as previously described [41]. Inhibition of miR-16-5p was performed by transfection of 180 pmol of mirVana[®] has-miR-16-5p specific inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) using Lipofectamine[®] RNAiMA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Cells were treated with 2 μ M of tunicamycin (TN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 6 and 18 h to induce the ER stress.

4.5. RNA Isolation and Real-Time Quantitative RT-qPCR

The MagMAX[™] mirVana Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) was used to isolate the total RNA from AC16 cells. RNA was reverse-transcribed using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. For miR-16-5p, U6 snRNA, and

GAPDH gene expression analysis, a commercial Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA) was used. Relative quantification of mRNA levels (primer pairs shown in Table 2) was executed using 6.5 ng of cDNA, forward and reverse primers at 100 nM each, and PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The mRNA levels were normalized to GAPDH. The expression levels were calculated by the Livak formula, and the expression of the control group was set to 1.

Table 2. Quantitative real-time polymerase chain reaction primer pair sequence.

Gene	Forward	Reverse
ATF6	5'-AATACTGAACATATGGACCTATGAGCA-3'	5'-TGCAGGGCTCAGACTAGG-3'
ATG14	5'-TGGGGACTACTCTGCCTACTACA-3'	5'-GGGTTACTCTGCTCCATGTCA-3'
BCL-2	5'-AGCACGTGCACAGCTTCA-3'	5'-GTCCACGGGTGAAACAGC-3'
CATALASE	5'-TCTGGACAAGTACAATGCTGAGA-3'	5'-TAAGCTTCGCTGCACAGGT-3'
CHOP	5'-TCACCACACCTGAAAGCAGA-3'	5'-TCITTCAGGTCCTCATACCA-3'
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-AATACGACCAAAATCCGTTGACT-3'
GRP78	5'-AATGACCAGAATCGCCTGAC-3'	5'-ATGCGCTCCTTGAGCTTTT-3'
GSH	5'-CCTGCTAGTGGATGCTGTCA-3'	5'-TCATCCTGTTGATGGTGCT-3'
IL-6	5'-GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA-3'	5'-CTGCAGCCACTGGTCTCTGT-3'
SOD1	5'-TCCATGTTTCATGAGTTTGGAGAT-3'	5'-CCCACCGTGTGTTTCTGGATA-3'
TNNT2	5'-GGCTGCAGTGGCTACAGG-3'	5'-CTGTCACCAAGCAATACAGC-3'
XBP1	5'-TGCCTAGTCTGGAGCTATGCT-3'	5'-CCCACAGAAGCAGAACTTT-3'

4.6. Western Blot Analysis

Transfected AC16 cells were harvested in RIPA, and protein concentration was determined using a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Equal amounts (20 µg) of protein were loaded, electrophoresed on 8–12% SDS-PAGE. Membranes were incubated with specific monoclonal anti-Catalase (diluted 1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-SOD1 (diluted 1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-GPx1 (diluted 1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), anti-GAPDH (diluted 1:5000; Invitrogen, Rockford, IL, USA) and monoclonal anti-β-Actin–Peroxidase antibody (diluted 1:50,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) overnight at 4 °C with constant agitation. Following incubation, membranes were washed and incubated for 1 h at room temperature with HRP-linked secondary anti-mouse IgG (diluted 1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA) or anti-rabbit IgG (diluted 1:10,000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA). After washing, immunoreactive bands were visualized using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The immunoreactive bands were analyzed using a lab analysis software imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The density of each band was evaluated with Image Lab analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). β-Actin and GAPDH were used as loading controls and values were normalized to the signals obtained with control samples.

4.7. Oxygen Consumption Rate (OCR) Measurement

AC16 cells were seeded in each well of a Seahorse XF-24 plate and transfected as described above. The Seahorse XFe24 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to measure OCR in AC16 cells. Cells were transfected in customized Seahorse 24-well plates and infected as described above. Then, 24 h post-transfection, the cells were incubated for 1 h in XF Assay Medium (Seahorse Bioscience, Santa Clara, CA, USA) plus 5 mM glucose for a typical bioenergetic profile; the OCR of basal respiration was initially measured, followed by exposure to 1 µM oligomycin (an ATP synthase inhibitor), which allowed the detection of the amount of O₂ consumed by ATP synthesis, H⁺ leak, and other oxidases. Then, 1 µM of the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) was added to quantify the maximal respiratory capacity, followed by 1 µM of rotenone and 1 µM of antimycin A, a mix of inhibitors of the complexes I and III of the mitochondrial electron transport chain (ETC),

which fully depleted mitochondrial O₂ consumption. OCR data were calculated using Wave software v. 2.6.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and data were normalized per microgram of protein [72].

4.8. Luciferase Reporter Assay

ATF6 3'UTR constructs were PCR-amplified and cloned into the pMIR-REPORT vector. Then, 3T3 fibroblasts (ATCC) were co-transfected with 100 ng of the ATF6 luciferase vector and 300 ng of pcLux vector control for internal normalization. Luciferase activity was measured 18 h after transfection by using the Pierce Gaussia Luciferase Flash Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and normalized to pcLux vector control by using the Pierce Cypridina Luciferase Flash Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). In all cases, transfections were carried out in triplicate.

4.9. Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM and n denotes the number of replicates for each experiment. Outliers were identified through theROUT method, using a $Q = 1\%$. The normal distribution of each variable was verified with the Shapiro–Wilk test. Statistical differences ($p < 0.05$) between the experimental groups were assessed using a two-tailed, unpaired Student's t test for Gaussian distributions. For non-Gaussian distributions, a Mann–Whitney non-parametric test was used. All the statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.0 software (San Diego, CA, USA).

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and R.T.; methodology, R.T., A.M., F.B. and A.P.-S.; formal analysis, F.B., M.A., E.C. and C.G.-P.; investigation, F.B., R.T., A.M. and A.P.-S.; resources, F.B., A.P.-S., O.C., G.S.-B., M.Q.-F. and M.R.; writing—original draft preparation, F.B., R.T. and A.M.; writing—review and editing, F.B., A.P.-S., R.T., A.M., A.P.-S., O.C., G.S.-B., M.Q.-F., M.R., M.A., E.C., C.G.-P. and D.F.; visualization, F.B., R.T., A.M., A.P.-S., O.C. and D.F.; supervision, R.T. and A.M.; project administration, R.T.; funding acquisition, R.T. and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants in the framework of the European Regional Development Fund (ERDF) Integrated Territorial Initiative (ITI PI0048-2017 and ITI0033_2019), a clinical research grant from the Spanish Society of Cardiology for Basic Research in cardiology (PI0012_2019), Plan Propio de INIBICA (PI-INIBICA 2019-13).

Institutional Review Board Statement: The study protocol was approved by the Andalusian Biomedical Research Ethics committee. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of Almería (protocol code 133_2019 and 29/01/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients for paper publication.

Data Availability Statement: In-data transparency is guaranteed. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We would like to thank Galan Pacheco for the statistical support and Thalia Belmonte and Maria Calderon-Dominguez for their scientific support and technical help.

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

References

1. Pinto, Y.M.; Elliott, P.M.; Arbustini, E.; Adler, Y.; Anastasakis, A.; Böhm, M.; Duboc, D.; Gimeno, J.; de Groote, P.; Imazio, M.; et al. Proposal for a Revised Definition of Dilated Cardiomyopathy, Hypokinetic Non-Dilated Cardiomyopathy, and Its Implications for Clinical Practice: A Position Statement of the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 1850–1858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Stehlik, J.; Edwards, L.B.; Kucheryavaya, A.Y.; Benden, C.; Christie, J.D.; Dobbels, F.; Kirk, R.; Rahmel, A.O.; Hertz, M.I. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-Eighth Adult Heart Transplant Report—2011. *J. Heart Lung Transplant.* **2011**, *30*, 1078–1094. [\[CrossRef\]](#)

3. Merlo, M.; Stolfo, D.; Anzini, M.; Negri, F.; Pinamonti, B.; Barbati, G.; Ramani, F.; Lenarda, A.D.; Sinagra, G. Persistent Recovery of Normal Left Ventricular Function and Dimension in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy during Long-term Follow-up: Does Real Healing Exist? *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e001504. [\[CrossRef\]](#)
4. Belch, J.J.; Bridges, A.B.; Scott, N.; Chopra, M. Oxygen Free Radicals and Congestive Heart Failure. *Heart* **1991**, *65*, 245–248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Hill, M.F.; Singal, P.K. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 291–300.
6. Hill, M.F.; Singal, P.K. Right and Left Myocardial Antioxidant Responses During Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction. *Circulation* **1997**, *96*, 2414–2420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Mallat, Z.; Philip, I.; Lebre, M.; Chatel, D.; Maclouf, J.; Tedgui, A. Elevated Levels of 8-Iso-Prostaglandin F₂α in Pericardial Fluid of Patients with Heart Failure: A Potential Role for In Vivo Oxidant Stress in Ventricular Dilatation and Progression to Heart Failure. *Circulation* **1998**, *97*, 1536–1539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Ide, T.; Tsutsui, H.; Hayashidani, S.; Kang, D.; Suematsu, N.; Nakamura, K.; Utsumi, H.; Hamasaki, N.; Takeshita, A. Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction Associated with Oxidative Stress in Failing Hearts After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 529–535. [\[CrossRef\]](#)
9. Takimoto, E.; Champion, H.C.; Li, M.; Ren, S.; Rodriguez, E.R.; Tavazzi, B.; Lazzarino, G.; Paolocci, N.; Gabrielson, K.L.; Wang, Y.; et al. Oxidant Stress from Nitric Oxide Synthase-3 Uncoupling Stimulates Cardiac Pathologic Remodeling from Chronic Pressure Load. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1221–1231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Matsushima, S.; Ide, T.; Yamato, M.; Matsusaka, H.; Hattori, F.; Ikeuchi, M.; Kubota, T.; Sunagawa, K.; Hasegawa, Y.; Kurihara, T.; et al. Overexpression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* **2006**, *113*, 1779–1786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Cesselli, D.; Jakoniuk, I.; Barlucchi, L.; Beltrami, A.P.; Hintze, T.H.; Nadal-Ginard, B.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P. Oxidative Stress-Mediated Cardiac Cell Death Is a Major Determinant of Ventricular Dysfunction and Failure in Dog Dilated Cardiomyopathy. *Circ. Res.* **2001**, *89*, 279–286. [\[CrossRef\]](#)
12. Mollnau, H.; Oelze, M.; August, M.; Wendt, M.; Daiber, A.; Schulz, E.; Baldus, S.; Kleschyov, A.L.; Materna, A.; Wenzel, P.; et al. Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in an Experimental Model of Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *ATVB* **2005**, *25*, 2554–2559. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Minhas, K.M.; Saraiva, R.M.; Schuleri, K.H.; Lehrke, S.; Zheng, M.; Saliaris, A.P.; Berry, C.E.; Vandegaer, K.M.; Li, D.; Hare, J.M. Xanthine Oxidoreductase Inhibition Causes Reverse Remodeling in Rats with Dilated Cardiomyopathy. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 271–279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Lu, D.; Ma, Y.; Zhang, W.; Bao, D.; Dong, W.; Lian, H.; Huang, L.; Zhang, L. Knockdown of Cytochrome P450 2E1 Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in the CTnT R141W Dilated Cardiomyopathy Transgenic Mice. *Hypertension* **2012**, *60*, 81–89. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D.P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1287–1312. [\[CrossRef\]](#)
17. Giordano, F.J. Oxygen, Oxidative Stress, Hypoxia, and Heart Failure. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 500–508. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Gaucher, C.; Boudier, A.; Bonetti, J.; Clarot, I.; Leroy, P.; Parent, M. Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants* **2018**, *7*, 62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Ding, W.; Yang, L.; Zhang, M.; Gu, Y. Reactive Oxygen Species-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to Aldosterone-Induced Apoptosis in Tubular Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *418*, 451–456. [\[CrossRef\]](#)
20. Cao, S.S.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 396–413. [\[CrossRef\]](#)
21. Gu, S.; Chen, C.; Jiang, X.; Zhang, Z. ROS-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction Underlie Apoptosis Induced by Resveratrol and Arsenic Trioxide in A549 Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *245*, 100–109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. McLendon, P.M.; Robbins, J. Proteotoxicity and Cardiac Dysfunction. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1863–1882. [\[CrossRef\]](#)
23. Arrieta, A.; Blackwood, E.A.; Glembotski, C.C. ER Protein Quality Control and the Unfolded Protein Response in the Heart. In *Coordinating Organismal Physiology Through the Unfolded Protein Response*; Current Topics in Microbiology and Immunology; Wiseman, R.L., Haynes, C.M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; Volume 414, pp. 193–213. [\[CrossRef\]](#)
24. Hetz, C.; Papa, F.R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 169–181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Schröder, M.; Kaufman, R.J. ER Stress and the Unfolded Protein Response. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *569*, 29–63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Schröder, M.; Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 739–789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2277–2294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

28. Harding, H.P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P.D.; Calton, M.; Sadri, N.; Yun, C.; Popko, B.; Paules, R.; et al. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 619–633. [\[CrossRef\]](#)
29. Jin, J.K.; Blackwood, E.A.; Azizi, K.; Thuermer, 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Minamino, T.; Kitakaze, M. ER Stress in Cardiovascular Disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 1105–1110. [\[CrossRef\]](#)
31. 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: ER Stress in the Heart. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 1293–1304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Callis, T.E.; Chen, J.-F.; Wang, D.-Z. MicroRNAs in Skeletal and Cardiac Muscle Development. *DNA Cell Biol.* **2007**, *26*, 219–225. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Callis, T.E.; Wang, D.-Z. Taking MicroRNAs to Heart. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 254–260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Yan, S.; Jiao, K. Functions of MiRNAs during Mammalian Heart Development. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Chistiakov, D.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Cardiac-Specific MiRNA in Cardiogenesis, Heart Function, and Cardiac Pathology (with Focus on Myocardial Infarction). *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *94*, 107–121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Duygu, B.; de Windt, L.J.; da Costa Martins, P.A. Targeting MicroRNAs in Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* **2016**, *26*, 99–110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Colpaert, R.M.W.; Calore, M. MicroRNAs in Cardiac Diseases. *Cells* **2019**, *8*, 737. [\[CrossRef\]](#)
38. Kreutzer, F.P.; Fiedler, J.; Thum, T. Non-coding RNAs: Key Players in Cardiac Disease. *J. Physiol.* **2020**, *598*, 2995–3003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Li, M.; Duan, L.; Li, Y.; Liu, B. Long Noncoding RNA/Circular Noncoding RNA–MiRNA–mRNA Axes in Cardiovascular Diseases. *Life Sci.* **2019**, *233*, 116440. [\[CrossRef\]](#)
40. Omidkhoda, N.; Wallace Hayes, A.; Reiter, R.J.; Karimi, G. The Role of MicroRNAs on Endoplasmic Reticulum Stress in Myocardial Ischemia. *Card. Hypertrophy. Pharmacol. Res.* **2019**, *150*, 104516. [\[CrossRef\]](#)
41. Calderon-Dominguez, M.; Belmonte, T.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos-Sánchez, M.; Fernández-Armenta, J.; Pérez-Navarro, A.; Cesar, S.; Peña-Peña, L.; Vea, A.; Llorente-Cortés, V.; et al. Emerging Role of MicroRNAs in Dilated Cardiomyopathy: Evidence Regarding Etiology. *Transl. Res.* **2020**, *215*, 86–101. [\[CrossRef\]](#)
42. Nonaka, C.K.V.; Macêdo, C.T.; Cavalcante, B.R.R.; de Alcântara, A.C.; Silva, D.N.; Bezerra, M.d.R.; Caria, A.C.I.; Tavora, F.R.F.; Neto, J.D.d.S.; Noya-Rabelo, M.M.; et al. Circulating MiRNAs as Potential Biomarkers Associated with Cardiac Remodeling and Fibrosis in Chagas Disease Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4064. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Calderon-Dominguez, M.; Mangas, A.; Belmonte, T.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos, M.; Toro, R. Ischemic Dilated Cardiomyopathy Pathophysiology through MicroRNA-16-5p. *Rev. Española Cardiol. (Engl. Ed.)* **2021**, *74*, 740–749. [\[CrossRef\]](#)
44. Kaneda, H.; Taguchi, J.; Ogasawara, K.; Aizawa, T.; Ohno, M. Increased Level of Advanced Oxidation Protein Products in Patients with Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **2002**, *162*, 221–225. [\[CrossRef\]](#)
45. Lynch, T.L.; Sivaguru, M.; Velayutham, M.; Cardounel, A.J.; Michels, M.; Barefield, D.; Govindan, S.; dos Remedios, C.; van der Velden, J.; Sadayappan, S. Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 424751. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Peoples, J.N.; Saraf, A.; Ghazal, N.; Pham, T.T.; Kwong, J.Q. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Chen, Q.; Thompson, J.; Hu, Y.; Das, A.; Lesnfsky, E.J. Metformin Attenuates ER Stress–Induced Mitochondrial Dysfunction. *Transl. Res.* **2017**, *190*, 40–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Rasool, M.; Malik, A.; Butt, T.T.; Ashraf, M.A.B.; Rasool, R.; Zahid, A.; Waqar, S.; Asif, M.; Zaheer, A.; Jabbar, A.; et al. Implications of Advanced Oxidation Protein Products (AOPPs), Advanced Glycation End Products (AGEs) and Other Biomarkers in the Development of Cardiovascular Diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 334–339. [\[CrossRef\]](#)
49. Hullinger, T.G.; Montgomery, R.L.; Seto, A.G.; Dickinson, B.A.; Semus, H.M.; Lynch, J.M.; Dalby, C.M.; Robinson, K.; Stack, C.; Latimer, P.A.; et al. Inhibition of MiR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury. *Circ. Res.* **2012**, *110*, 71–81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Zhang, H.; Zhang, Y.; Teng, Z. Downregulation of MiR-16 Protects H9c2(2-1) Cells against Hypoxia/Reoxygenation Damage by Targeting CIAPIN1 and Regulating the NF-κB Pathway. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 3113–3122. [\[CrossRef\]](#)
51. Wang, X.; Shang, Y.; Dai, S.; Wu, W.; Yi, F.; Cheng, L. MicroRNA-16-5p Aggravates Myocardial Infarction Injury by Targeting the Expression of Insulin Receptor Substrates 1 and Mediating Myocardial Apoptosis and Angiogenesis. *CNR* **2020**, *17*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)
52. Liu, J.; Sun, F.; Wang, Y.; Yang, W.; Xiao, H.; Zhang, Y.; Lu, R.; Zhu, H.; Zhuang, Y.; Pan, Z.; et al. Suppression of MicroRNA-16 Protects against Acute Myocardial Infarction by Reversing Beta2-Adrenergic Receptor down-Regulation in Rats. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20122–20132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Ke, Z.P.; Xu, P.; Shi, Y.; Gao, A.-M. MicroRNA-93 Inhibits Ischemia-Reperfusion Induced Cardiomyocyte Apoptosis by Targeting PTEN. *Oncotarget* **2016**, *7*, 28796–28805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

55. Chen, Q.; Samidurai, A.; Thompson, J.; Hu, Y.; Das, A.; Willard, B.; Lesnfsky, E.J. Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Mitochondrial Dysfunction in Aged Hearts. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, 165899. [\[CrossRef\]](#)
56. Wang, S.; Hu, B.; Ding, Z.; Dang, Y.; Wu, J.; Li, D.; Liu, X.; Xiao, B.; Zhang, W.; Ren, R.; et al. ATF6 Safeguards Organelle Homeostasis and Cellular Aging in Human Mesenchymal Stem Cells. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Blackwood, E.A.; Azizi, K.; Thuerlauf, 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. [\[CrossRef\]](#)
58. Guo, F.-J.; Xiong, Z.; Lu, X.; Ye, M.; Han, X.; Jiang, R. ATF6 Upregulates XBP1S and Inhibits ER Stress-Mediated Apoptosis in Osteoarthritis Cartilage. *Cell. Signal.* **2014**, *26*, 332–342. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Rutkowski, D.T.; Hegde, R.S. Regulation of Basal Cellular Physiology by the Homeostatic Unfolded Protein Response. *Journal of Cell Biology* **2010**, *189*, 783–794. [\[CrossRef\]](#)
60. Hetz, C. The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 89–102. [\[CrossRef\]](#)
61. Liu, Y.; Adachi, M.; Zhao, S.; Hareyama, M.; Koong, A.C.; Luo, D.; Rando, T.A.; Imai, K.; Shinomura, Y. Preventing Oxidative Stress: A New Role for XBP1. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 847–857. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Puthalakath, H.; O'Reilly, L.A.; Gunn, P.; Lee, L.; Kelly, P.N.; Huntington, N.D.; Hughes, P.D.; Michalak, E.M.; McKimm-Breschkin, J.; Motoyama, N.; et al. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell* **2007**, *129*, 1337–1349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Cimmino, A.; Calin, G.A.; Fabbri, M.; Iorio, M.V.; Ferracin, M.; Shimizu, M.; Wojcik, S.E.; Aqeilan, R.I.; Zupo, S.; Dono, M.; et al. MiR-15 and MiR-16 Induce Apoptosis by Targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13944–13949. [\[CrossRef\]](#)
64. Slomp, A.; Peperzak, V. Role and Regulation of Pro-Survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 533. [\[CrossRef\]](#)
65. Elliott, P.; Andersson, B.; Arbustini, E.; Bilinska, Z.; Cecchi, F.; Charron, P.; Dubourg, O.; Kuhl, U.; Maisch, B.; McKenna, W.J.; et al. Classification of the Cardiomyopathies: A Position Statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur. Heart J.* **2007**, *29*, 270–276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Belmonte, T.; Mangas, A.; Calderon-Dominguez, M.; Quezada-Feijoo, M.; Ramos, M.; Campuzano, O.; Gomez, S.; Peña, M.L.; Cubillos-Arango, A.M.; Dominguez, F.; et al. Peripheral MicroRNA Panels to Guide the Diagnosis of Familial Cardiomyopathy. *Transl. Res.* **2020**, *218*, 1–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Moore, K.; Roberts, L.J. Measurement of Lipid Peroxidation. *Free Radic. Res.* **1998**, *28*, 659–671. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Witko-Sarsat, V.; Friedlander, M.; Capeillère-Blandin, C.; Nguyen-Khoa, T.; Nguyen, A.T.; Zingraff, J.; Jungers, P.; Descamps-Latscha, B. Advanced Oxidation Protein Products as a Novel Marker of Oxidative Stress in Uremia. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1304–1313. [\[CrossRef\]](#)
69. Aebi, H. Catalase in Vitro. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984; Volume 105, pp. 121–126. [\[CrossRef\]](#)
70. Bamforth, C.W. Superoxide dismutase in barley. *J. Inst. Brew.* **1983**, *89*, 420–423. [\[CrossRef\]](#)
71. Günzler, W.A.; Kremers, H.; Flohé, L. An Improved Coupled Test Procedure for Glutathione Peroxidase (EC 1.11.1.9.) in Blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* **1974**, *12*, 444–448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Zhang, J.; Nuebel, E.; Wisidagama, D.R.R.; Setoguchi, K.; Hong, J.S.; Van Horn, C.M.; Imam, S.S.; Vergnes, L.; Malone, C.S.; Koehler, C.M.; et al. Measuring Energy Metabolism in Cultured Cells, Including Human Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cells. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1068–1085. [\[CrossRef\]](#)

17.3 ARTÍCULO 3.

**IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO ALGORITMO PARA LA REINTERPRETACIÓN DE VARIANTES
AMBIGUAS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA GENÉTICA**



Article

Implementing a New Algorithm for Reinterpretation of Ambiguous Variants in Genetic Dilated Cardiomyopathy

Alexandra Pérez-Serra ^{1,2,†}, Rocío Toro ^{3,4,†}, Estefanía Martínez-Barrios ^{5,6,7}, Anna Iglesias ^{1,2}, Anna Fernandez-Falgueras ^{1,2,8}, Mireia Alcalde ^{1,2}, Mónica Coll ^{1,2}, Marta Puigmulé ^{1,2}, Bernat del Olmo ^{1,2}, Ferran Picó ^{1,2}, Laura Lopez ^{1,2}, Elena Arbelo ^{2,5,9}, Sergi Cesar ^{5,6,7}, Coloma Tiron de Llano ⁸, Alipio Mangas ^{3,4,10}, Josep Brugada ^{2,5,9}, Georgia Sarquella-Brugada ^{5,6,7,11}, Ramon Brugada ^{1,2,8,11,*}, ‡ and Oscar Campuzano ^{1,2,11,*}, ‡

- ¹ Cardiovascular Genetics Center, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI-CERCA), Parc Hospitalari Martí i Julià, Edifici M2, 17190 Salt, Spain; aperez@idibgi.org (A.P.-S.); annai@brugada.org (A.I.); annafalgueras.girona.ics@gencat.cat (A.F.-F.); malcalde@gencardio.com (M.A.); monicacoll.girona.ics@gencat.cat (M.C.); mpuigmule.girona.ics@gencat.cat (M.P.); bdelolmo@gencardio.com (B.d.O.); ferran.pico@gencardio.com (F.P.); llopez@gencardio.com (L.L.)
- ² Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), 28029 Madrid, Spain; elenaarbelo@secardiologia.es (E.A.); josep@brugada.org (J.B.)
- ³ Medicine Department, School of Medicine, Cadiz University, 11003 Cadiz, Spain; rocio.toro@uca.es (R.T.); alipio.mangas@uca.es (A.M.)
- ⁴ Research Unit, Biomedical Research and Innovation Institute of Cadiz (INIBICA), Puerta del Mar University Hospital, 11009 Cadiz, Spain
- ⁵ European Reference Network for Rare, Low Prevalence and Complex Diseases of the Heart (ERN GUARD-Heart), 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; estefania.martinez@sjd.es (E.M.-B.); sergi.cesar@gmail.com (S.C.); georgia@brugada.org (G.S.-B.)
- ⁶ Pediatric Arrhythmias, Inherited Cardiac Diseases and Sudden Death Unit, Cardiology Department, Sant Joan de Déu Hospital de Barcelona, 08950 Barcelona, Spain
- ⁷ Arritmies Pediàtriques, Cardiologia Genètica i Mort Sobtada, Malalties Cardiovasculars en el Desenvolupament, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, 08950 Barcelona, Spain
- ⁸ Cardiology Service, Hospital Josep Trueta, University of Girona, 17007 Girona, Spain; ctiron.girona.ics@gencat.cat
- ⁹ Arrhythmias Unit, Hospital Clinic, University of Barcelona-IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain
- ¹⁰ Internal Medicine Department, Puerta del Mar University Hospital, School of Medicine, University of Cadiz, 11009 Cadiz, Spain
- ¹¹ Medical Science Department, School of Medicine, University of Girona, 17003 Girona, Spain
- * Correspondence: ramon@brugada.org (R.B.); oscar@brugada.org (O.C.)
- † Both equally contributed as co-first authors.
- ‡ Both equally contributed as co-senior authors.



Citation: Pérez-Serra, A.; Toro, R.; Martínez-Barrios, E.; Iglesias, A.; Fernandez-Falgueras, A.; Alcalde, M.; Coll, M.; Puigmulé, M.; del Olmo, B.; Picó, F.; et al. Implementing a New Algorithm for Reinterpretation of Ambiguous Variants in Genetic Dilated Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 3807. <https://doi.org/10.3390/ijms25073807>

Academic Editor: Kornelia Jaquet

Received: 19 February 2024

Revised: 13 March 2024

Accepted: 27 March 2024

Published: 29 March 2024



Copyright: © 2024 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: Dilated cardiomyopathy is a heterogeneous entity that leads to heart failure and malignant arrhythmias. Nearly 50% of cases are inherited; therefore, genetic analysis is crucial to unravel the cause and for the early identification of carriers at risk. A large number of variants remain classified as ambiguous, impeding an actionable clinical translation. Our goal was to perform a comprehensive update of variants previously classified with an ambiguous role, applying a new algorithm of already available tools. In a cohort of 65 cases diagnosed with dilated cardiomyopathy, a total of 125 genetic variants were classified as ambiguous. Our reanalysis resulted in the reclassification of 12% of variants from an unknown to likely benign or likely pathogenic role, due to improved population frequencies. For all the remaining ambiguous variants, we used our algorithm; 60.9% showed a potential but not confirmed deleterious role, and 24.5% showed a potential benign role. Periodically updating the population frequencies is a cheap and fast action, making it possible to clarify the role of ambiguous variants. Here, we perform a comprehensive reanalysis to help to clarify the role of most of ambiguous variants. Our specific algorithms facilitate genetic interpretation in dilated cardiomyopathy.

Keywords: sudden cardiac death; dilated cardiomyopathy; genetics; interpretation

1. Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is an entity characterized by left ventricular (LV) or biventricular dilatation in the absence of hypertension, valve disease, or coronary artery disease [1]. The heterogeneous etiology of DCM includes wide-ranging genetic and acquired disorders, leading to heart failure and the main cause of transplantation in young people worldwide.

Nowadays, a genetic origin of DCM (G-DCM) can be found in 20–30% of patients with DCM, increasing to 30–50% in those with a family history, mainly following an autosomal dominant pattern of inheritance [2]. DCM can manifest during adolescence or in young adults despite penetrance being age-dependent, and careful diagnostic work-up should be performed to identify the underlying cause and then consider an etiology-oriented management [1]. Nowadays, several rare alterations in more than 50 genes have been associated with G-DCM, despite comprehensive analysis concluding that many of these genes have limited or disputed evidence of causality [2,3]. Truncating variants in the titin gene (*TTN*) are found in up to 20% of G-DCM cases, being the most frequent cause of DCM in adults, so far. In pediatric populations, G-DCM is usually also associated with rare variants of *TTN*, but aggressive phenotypes have been also associated with deleterious variants in *MYH7*, *TNNT2*, *RBM20*, and *LMNA*. Additional deleterious variants related to G-DCM have also been identified in the following genes, although only a definite/robust association should be taken into account in clinical diagnosis: *ACTC1*, *ACTN2*, *BAG3*, *DES*, *DSP*, *FLNC*, *JPH2*, *LMNA*, *MYH7*, *NEXN*, *PLN*, *RBM20*, *SCN5A*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, and *VCL* [2,4,5].

In 2015, the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) structured standard terminology for classifying sequence variants that help clinical translation [6]. Identification of an alteration definitively classified as pathogenic or likely pathogenic (P/LP) following ACMG recommendations confirms the genetic origin and helps distinguish G-DCM from other cardiomyopathies or overlapped phenotypes. A recent study has shown an increased risk of developing cardiomyopathy in individuals harboring a deleterious genetic variant compared with non-carriers [7]. In this way, those patients who harbor a rare variant classified as P/LP in a DCM-related gene had an increased risk of suffering the most severe phenotypes [8]. Recently, Stroeckx et al. suggested that a variant classified as ambiguous (variant unknown significance, VUS) in a robust DCM-associated gene is associated with an adverse prognosis, reinforcing the use of diagnostic gene panels only limited to definite DCM-associated genes [9]. These recent data highlight the crucial role of performing a genetic analysis with a suitable genetic interpretation. In addition, identification of a P/LP alteration allows familial screening to identify carriers, and consequently, those at risk of disease. Therefore, updating variants classified as not following ACMG recommendations is highly recommended [10]. In addition, a close periodic cardiac follow-up should be performed on relatives who carry the deleterious variant for early detection of the phenotype and the adoption of personalized measures [11].

Current guidelines recommend genetic diagnosis, even in the absence of familial context or associated clinical features [2,12,13]. However, it is not always conclusive, due to lack of variant identification in any of the currently known genes or due to the identification of a VUS following ACMG recommendations. The patient's clinical history and family information are essential for the interpretation of variants but a lack of data or controversial available data impedes a conclusive classification [14]. Due to dynamic, continuous improvements in the data concerning rare variants, their reinterpretation may modify previous classifications, clarifying their clinical role, especially in rare variants previously classified as VUS. Thus, it may alter patient diagnosis and treatment, prenatal diagnosis or pre-implantation genetic diagnosis, and the screening of at-risk family members.

Up to now, few studies have focused on how often reanalysis is necessary and what the management implications are in inherited arrhythmogenic syndromes [15,16], as well as familial cardiomyopathies [17]. In DCM, few studies focused on variant reevaluation are published nowadays, showing nearly a 30% decrease in ambiguity in VUSs classified

more than ten years ago [18]. However, a large burden of ambiguous variants remains. The development of improved tools to clarify the role of VUS is necessary [8,19]. In this approach, we focused on stringent gene selection for DCM genetic testing, helping to reduce the number of VUSs. We move one step forward and propose a new algorithm including definite-gene DCM, and also the parameters of population frequencies which aim to clarify this critical point, facilitating accurate genetic classification in G-DCM patients.

2. Results

Our retrospective study included 65 non-related Caucasian patients with a definitive clinical diagnosis of DCM. Patients were diagnosed between 2016 and 2019, according to the clinical guidelines available at the time of the study. Exhaustive genetic analysis of all genes related to DCM identified at least one rare variant classified as a VUS, following ACMG recommendations. We reinterpreted all rare variants according to the present available data.

A total of 125 rare variants were located in 16 different genes with a definite association with DCM: one in *ACTC1* (0.8%), three in *ACTN2* (2.4%), one in *BAG3* (0.8%), one in *DES* (0.8%), four in *DSP* (3.2%), two in *FLNC* (1.6%), two in *JPH2* (1.6%), four in *LMNA* (3.2%), five in *MYH7* (4%), six in *RBM20* (4.8%), two in *SCN5A* (1.6%), two in *TNNC1* (1.6%), one in *TNNI3* (0.8%), six in *TNNT2* (4.8%), eighty-one in *TTN* (64.8%), and four in *VCL* (3.2%). Most of the rare variants were missense (95 variants, 76%), and eleven indels (8.8%) including one gross deletion, seven intronic variants (5.6%), and twelve nonsense variants (9.5%), including one stoploss (Table 1; Figure 1).

Table 1. Genetic data of variants.

Patient	Gene	Nucleotide	Protein	dbSNP	ClinVar	GnomAD (MAF%)	Classification (Year)	Classification 2023
1	<i>TNNT2</i>	c.860G>A	p.Trp287Ter	rs727504247	LP	NA	VUS (2016)	LP
1	<i>TTN</i>	c.47951G>A	p.Arg15984His	rs201774108	VUSc	0.0001	VUS (2016)	VUS
2	<i>TTN</i>	c.73195G>A	p.Val24399Ile	rs1257567608	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
2	<i>TTN</i>	c.57388C>T	p.Arg19130Cys	rs72646861	LB	0.827	VUS (2016)	LB
2	<i>TTN</i>	c.53117C>T	p.Pro17706Leu	rs72646845	LB	0.369	VUS (2016)	LB
3	<i>ACTN2</i>	c.2051A>T	p.Asn684Ile	rs576783493	VUSc	0.0001	VUS (2016)	VUS
3	<i>TTN</i>	c.93125G>A	p.Gly31042Asp	rs373754986	VUS	0.007	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
3	<i>TTN</i>	c.76456G>C	p.Asp25486His	rs780958039	VUS	0.0008	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
4	<i>ACTN2</i>	c.1426G>A	p.Ala476Thr	rs142943120	VUSc	0.027	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
4	<i>TTN</i>	c.57978del	p.Val19327PhefsTer10	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
4	<i>TTN</i>	c.76559G>A	p.Ser25520Asn	rs200450022	VUSc	0.061	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
4	<i>TTN</i>	c.72764G>C	p.Gly24225Ala	rs114071241	VUS	0.001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
4	<i>TTN</i>	c.17066G>C	p.Gly5689Ala	rs200118743	VUSc	0.063	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
4	<i>TTN</i>	c.4675G>A	p.Val1559Ile	rs538451328	NA	0.0003	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
5	<i>TTN</i>	c.98971G>C	p.Glu32991Gln	rs199632397	VUSc	0.042	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
5	<i>TTN</i>	c.27659G>A	p.Arg9220Gln	rs727504757	VUS	0.003	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
6	<i>TTN</i>	c.45392G>A	p.Arg15131His	rs72646808	VUSc	0.185	VUS (2016)	LB
7	<i>TNNT2</i>	c.629_631del	p.Lys210del	rs45578238	VUS	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
8	<i>MYH7</i>	c.1106G>A	p.Arg369Gln	rs397516089	LP	0.00006	VUS (2016)	LP
9	<i>TTN</i>	c.73967A>G	p.Asn24656Ser	rs368443217	VUSc	0.008	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
9	<i>TTN</i>	c.65012T>A	p.Met21671Lys	rs750298083	VUSc	0.004	VUS (2016)	VUS
9	<i>TTN</i>	c.51830G>A	p.Arg17277His	rs201457934	VUSc	0.01	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
9	<i>TTN</i>	c.9247G>A	p.Glu3083Lys	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
9	<i>MYH7</i>	c.2711G>A	p.Arg904His	rs397516165	LP	0.0001	VUS (2016)	LP
10	<i>DSP</i>	c.1266+6G>T	NA	rs73375345	LB	0.037	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
10	<i>TTN</i>	c.20920A>G	p.Ser6974Gly	rs72648980	VUSc	0.062	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
10	<i>VCL</i>	c.2862_2864del	p.Leu955del	rs397517237	VUSc	0.021	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)

Table 1. Cont.

Patient	Gene	Nucleotide	Protein	dbSNP	ClinVar	GnomAD (MAF%)	Classification (Year)	Classification 2023
11	SCN5A	c.6010T>C	p.Phe2004Leu	rs41311117	VUSc	0.198	VUS (2016)	LB
12	TTN	c.72970C>T	p.Gln24324Ter	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
13	TTN	c.49249G>A	p.Asp16417Asn	rs1244503464	NA	0.0004	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
14	TTN	c.12814G>T	p.Asp4272Tyr	rs72648940	VUSc	0.0005	VUS (2016)	VUS
15	TTN	c.77076A>C	p.Glu25692Asp	rs370547473	NA	0.004	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
16	TTN	c.32932C>A	p.Pro10978Thr	rs1393076582	VUSc	NA	VUS (2016)	VUS
17	DES	c.179C>T	p.Ser60Leu	rs868853251	NA	0.0001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
17	TTN	c.46877G>A	p.Gly15626Asp	rs201802447	VUS	0.007	VUS (2016)	VUS
17	TTN	c.1066G>C	p.Glu356Gln	rs144531477	VUSc	0.015	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
18	TTN	c.95137A>G	p.Ile31713Val	rs758945559	NA	0.0008	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
18	TTN	c.30484C>A	p.Pro10162Thr	rs532102837	VUSc	0.058	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
18	DSP	c.6799A>T	p.Thr2267Ser	rs181378432	LB	0.009	VUS (2016)	VUS
18	LMNA	c.1621C>T	p.Arg541Cys	rs56984562	LP	0.0001	VUS (2016)	LP
19	RBM20	c.1900C>T	p.Arg634Trp	rs796734066	LP	NA	VUS (2016)	LP
20	DSP	del ex. 21_24	NA	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
21	MYH7	c.1371A>G	p.Ile457Met	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
22	TTN	c.94724T>C	p.Met31575Thr	rs397517786	VUSc	0.007	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
22	TTN	c.62687G>T	p.Gly20896Val	rs549938348	VUS	0.0004	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
23	RBM20	c.1906C>T	p.Arg636Cys	rs267607002	VUSc	0.0001	VUS (2016)	VUS
24	JPH2	c.1736C>T	p.Pro579Leu	rs953353202	VUS	0.001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
24	RBM20	c.1980C>A	p.Ser660Arg	NA	NA	0.00007	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
25	RBM20	c.2200C>G	p.Arg734Gly	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
26	TTN	c.57212G>A	p.Arg19071Gln	rs373282633	VUS	0.003	VUS (2016)	VUS
26	TTN	c.48221T>A	p.Leu16074Gln	rs140714512	VUSc	0.051	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
26	TTN	c.29645A>C	p.Lys9882Thr	rs760742068	VUS	0.001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
27	LMNA	c.1930C>T	p.Arg644Cys	rs1420000963	VUSc	0.201	VUS (2016)	LB
27	TTN	c.77188C>T	p.Arg25730Trp	rs779581886	VUS	0.002	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
27	TTN	c.60581T>C	p.Leu20194Pro	rs1359881893	VUS	0.0008	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
28	RBM20	c.1913C>T	p.Pro638Leu	rs267607003	LP	0.0003	VUS (2016)	LP
28	TTN	c.74942C>T	p.Ala24981Val	rs749950083	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
28	TTN	c.73501C>G	p.Pro24501Ala	rs770542451	NA	0.0004	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
28	TTN	c.1333G>A	p.Ala445Thr	rs142414432	VUSc	0.021	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
29	LMNA	c.1949A>G	p.Asn650Ser	rs775728847	VUS	0.0003	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
29	TTN	c.38807A>G	p.Asn12936Ser	rs1184631064	VUS	0.0008	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
30	ACTN2	c.1040C>T	p.Thr347Met	rs727504590	VUSc	0.009	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
31	RBM20	c.3684A>G	p.Ter1228TrpextTer33	rs1845123103	NA	0.0001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
31	TTN	c.40001G>A	p.Gly13334Glu	rs561284948	VUS	0.001	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
31	TTN	c.20863C>T	p.Pro6955Ser	rs1438804317	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
32	MYH7	c.602T>C	p.Ile201Thr	rs397516258	LP	0.0001	VUS (2016)	LP
32	TTN	c.71188G>A	p.Gly23730Arg	rs72648205	VUSc	0.034	VUS (2016)	VUS (VUS-LB)
33	TTN	c.82400G>A	p.Arg27467His	rs199895320	VUS	0.002	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
33	TTN	c.75575A>T	p.Asn25192Ile	rs200714263	VUS	0.002	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
34	TTN	c.9139_9150del	p.Ser3047_Thr3050del	NA	NA	NA	VUS (2016)	VUS (VUS-LP)
35	ACTC1	c.455-7C>T	NA	rs768363857	LB	0.003	VUS (2017)	VUS
35	TTN	c.53791C>T	p.Arg17931Ter	rs869312112	LP	NA	VUS (2017)	LP
35	TTN	c.33568T>G	p.Cys11190Gly	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
36	TTN	c.58846G>A	p.Gly19616Ser	rs1262240030	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
36	TTN	c.58590G>C	p.Gln19530His	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
36	TTN	c.8320G>A	p.Glu2774Lys	rs763666119	LB	0.0003	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
37	TNNI3	c.-8G>A	NA	rs773513015	VUSc	0.001	VUS (2017)	VUS
37	TTN	c.40796G>A	p.Arg13599Gln	rs778774812	VUS	0.001	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)

Table 1. Cont.

Patient	Gene	Nucleotide	Protein	dbSNP	ClinVar	GnomAD (MAF%)	Classification (Year)	Classification 2023
38	TTN	c.57709G>T	p.Val19237Leu	rs1397460981	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
39	TTN	c.95967dup	p.Arg31990ThrfsTer10	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
40	TTN	c.12389G>A	p.Cys4130Tyr	rs375577529	VUSc	0.008	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
40	VCL	c.2905G>A	p.Ala969Thr	rs199751261	VUS	0.002	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
41	LMNA	c.253C>G	p.Leu85Val	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
41	TTN	c.78602G>A	p.Gly26201Asp	rs756222422	NA	0.0004	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
41	TTN	c.64137G>C	p.Lys21379Asn	rs56019808	VUSc	0.014	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
41	TTN	c.36844+9A>G	NA	rs372725070	LB	0.013	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
41	TTN	c.21355G>T	p.Ala7119Ser	rs200972189	VUSc	0.02	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
42	TTN	c.92472G>C	p.Lys30824Asn	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
42	TTN	c.25810C>T	p.Arg8604Ter	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
42	TTN	c.28738+7T>G	NA	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
42	TTN	c.14656A>T	p.Thr4886Ser	rs794727816	VUS	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
43	TNNC1	c.400G>A	p.Glu134Lys	rs1553651640	VUS	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
43	TTN	c.95173A>G	p.Lys31725Glu	rs72629783	VUSc	0.021	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
43	TTN	c.31709T>C	p.Ile10570Thr	rs72650057	VUSc	0.013	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
44	TTN	c.56541G>A	p.Trp18847Ter	NA	LP	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
45	FLNC	c.3612del	p.His1205ThrfsTer65	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
46	TTN	c.19570G>A	p.Asp6524Asn	rs72648973	VUSc	0.075	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
47	TNNT2	c.476G>A	p.Arg159Gln	rs45501500	VUSc	NA	VUS (2017)	VUS
48	TTN	c.51369_51384del	p.Asp17123GlufsTer4	NA	NA	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
49	JPH2	c.572C>G	p.Pro191Arg	rs554853074	LB	0.045	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
49	TNNT2	c.230C>T	p.Pro77Leu	rs144900708	VUS	0.003	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
50	TTN	c.86270C>A	p.Ser28757Ter	NA	LP	NA	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
50	TTN	c.62666A>T	p.Asp20889Val	rs535816123	NA	0.002	VUS (2017)	VUS (VUS-LP)
50	TTN	c.47435T>C	p.Ile15812Thr	rs72646819	VUSc	0.007	VUS (2017)	VUS (VUS-LB)
50	TTN	c.16066A>G	p.Thr5356Ala	rs530353051	VUS	0.002	VUS (2017)	VUS
51	BAG3	c.903del	p.Arg301SerfsTer6	NA	NA	NA	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
51	TTN	c.29327A>G	p.Tyr9776Cys	rs72650035	VUSc	0.02	VUS (2018)	VUS (VUS-LB)
52	FLNC	c.1414del	p.Cys472ValfsTer20	NA	NA	NA	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
53	MYH7	c.5452C>T	p.Arg1818Trp	rs763073072	VUS	0.0005	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
54	TNNC1	c.394G>A	p.Asp132Asn	rs397516846	VUS	0.0003	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
55	TTN	c.24617A>G	p.Asn8206Ser	NA	NA	NA	VUS (2018)	VUS
55	TTN	c.12889+7A>T	NA	rs10200398	VUSc	0.07	VUS (2018)	VUS (VUS-LB)
56	TTN	c.20839G>A	p.Glu6947Lys	rs201326258	VUS	0.003	VUS (2018)	VUS
56	VCL	c.1620T>G	p.Asp540Glu	rs533622785	NA	0.0006	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
57	DSP	c.5673_5674dup	p.Lys1892ArgfsTer38	NA	NA	NA	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
57	SCN5A	c.2924G>A	p.Arg975Gln	rs753149586	VUS	0.005	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
58	TNNT2	c.835G>A	p.Gly279Arg	rs757664792	VUS	0.0004	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
59	TTN	c.9220C>T	p.Arg3074Ter	rs780706937	VUSc	NA	VUS (2018)	VUS
60	TTN	c.81493+1G>T	NA	NA	NA	NA	VUS (2018)	VUS (VUS-LP)
61	TNNT2	c.391C>G	p.Arg131Gly	rs74315380	LP	NA	VUS (2019)	VUS (VUS-LP)
62	TTN	c.78412C>T	p.Arg26138Ter	rs794729384	LP	0.0004	VUS (2019)	LP
63	TTN	c.67528G>T	p.Glu22510Ter	NA	NA	NA	VUS (2019)	VUS (VUS-LP)
64	TTN	c.39790C>T	p.Arg13264Ter	rs751746401	LP	0.0004	VUS (2019)	LP
65	TTN	c.59787G>A	p.Trp19929Ter	NA	NA	NA	VUS (2019)	VUS (VUS-LP)
65	VCL	c.158A>G	p.Asn53Ser	rs751938777	VUS	0.001	VUS (2019)	VUS (VUS-LP)

Genetic data of variants. LB: Likely Benign. LP: Likely Pathogenic. MAF: Minor Allele Frequency. NA: Not Available. VUS: Variant of Unknown Significance. VUSc: Variant of unknown significance with Controversial/Conflicting data. VUS-LP: Variant of Unknown Significance-Likely Pathogenic. VUS-LB: Variant of Unknown Significance-Likely Benign.

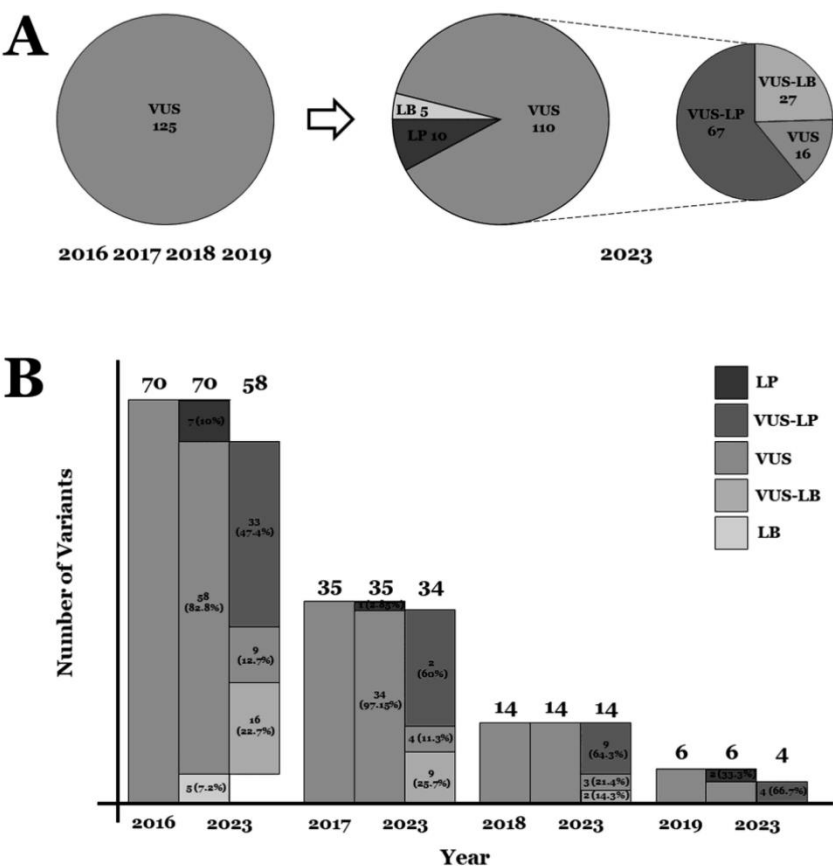


Figure 1. Global number/percentage of VUSs. (A) Global reclassification of variants. (B) Reclassification each year. LB: likely benign. VUS: variant of unknown significance. VUS-LP: variant of unknown significance—likely pathogenic. VUS-LB: variant of unknown significance—likely benign.

Our comprehensive analysis showed that 15 of the 125 rare variants (12%) were reclassified; five variants downgraded their role to LB and ten upgraded their level to LP. All rare variants downgraded the level of pathogenicity were missense (one in *LMNA*, one in *SCN5A*, and three in *TTN*) and modifications were due to increased MAF from the previous to current classification. Concerning the ten rare variants upgraded to LP, four were nonsense (one in *TNNT2*, three in *TTN*) and six missense (one in *LMNA*, three in *MYH7*, two in *RBM20*). The 110 rare variants previously classified as VUS remain currently as VUS. At this point, we developed three subgroups within the VUS category, as mentioned in the Methods section. We observed that 27 (24.54%) variants were reclassified as VUS-LB and 67 (60.9%) as VUS-LP. The remaining 16 (14.54%) rare variants remain as VUSs (Tables 1 and 2; Figures 1 and 2).

Table 2. Type, and classification of genetic variants.

2023		Intronic	Indels	Nonsense	Missense	Total
B		0	0	0	0	0
LB		0	0	0	5 (4%)	5 (4%)
VUS	VUS-LB	3 (2.4%)	1 (0.8%)	0	23 (18.4%)	27 (21.6%)
	VUS	2 (1.6%)	0	1 (0.8%)	13 (10.4%)	16 (12.8%)
	VUS-LP	2 (1.6%)	10 (8%)	7 (5.6%)	48 (38.4%)	67 (53.6%)
LP		0	0	4 (3.2%)	6 (4.8%)	10 (8%)
P		0	0	0	0	0
Total		7 (5.6%)	11 (8.8%)	12 (9.6%)	95 (76%)	125 (100%)

Type and classification of genetic variants. LB: likely benign. LP: likely pathogenic. VUS: variant of unknown significance. VUS-LP: variant of unknown significance—likely pathogenic. VUS-LB: variant of unknown significance—likely benign.

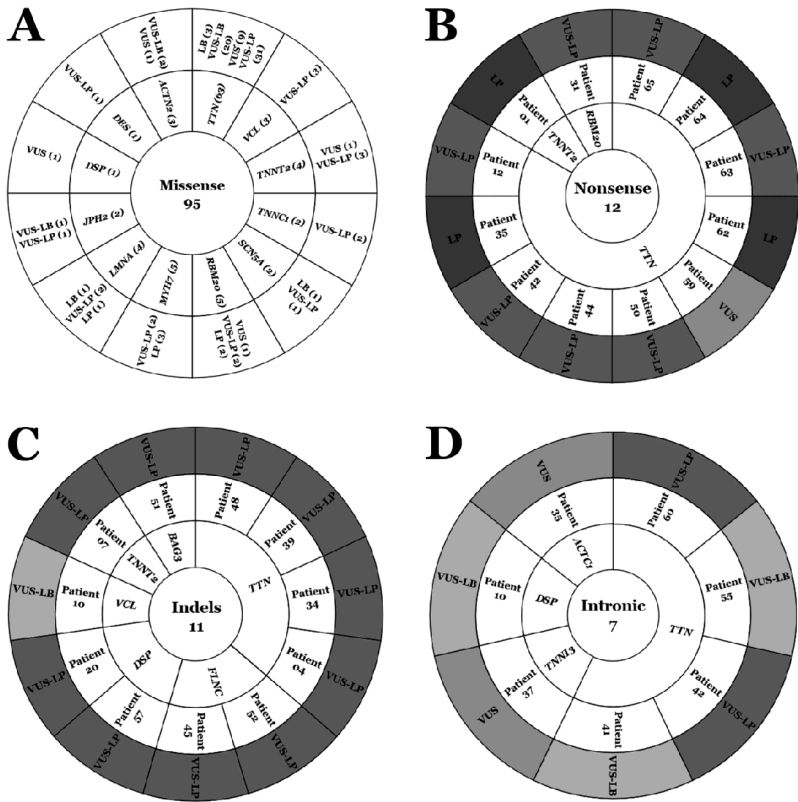


Figure 2. Number, type, and classification of variants. (A) Missense variants. (B) Nonsense variants. (C) Indel variants. (D) Intronic variants. LB: likely benign. VUS: variant of unknown significance. VUS-LP: variant of unknown significance—likely pathogenic. VUS-LB: variant of unknown significance—likely benign.

We also performed an analysis by gene (*ACTC1*, *ACTN2*, *BAG3*, *DES*, *DSP*, *FLNC*, *JPH2*, *LMNA*, *MYH7*, *RBM20*, *SCN5A*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TTN*, and *VCL*) and type of variant (missense, intronic, indels, and nonsense), as well as each year of previous classification (2016, 2017, 2018, and 2019) compared to current classification. Firstly, concerning years of previous classification, we observed that the further away that year was (2016 in our study), the more variability we found compared to 2023, after applying our algorithm. Additionally, the closer the year of classification to now, the greater the proportion of VUSs showed a tendency toward potential pathogenicity, as well as a lower tendency to play a potential benign role in DCM. Therefore, out of 70 VUS in 2016, five (7.14%) decreased to LB, and seven increased their pathogenicity to LP (10%). Inside the group of the remaining 58 VUSs, 33 seemed to show a tendency for increasing their potential deleterious role (56.89%) and 16 showed a tendency for decreasing their role to benignity (27.58%). In 2017, one of 35 increased its definitive role to LP (2.85). Of the remaining 34 VUSs, 21/34 seemed to show a tendency for the potential deleterious role (61.76%) and 9/34 a tendency for benignity (26.47%). In 2018, from the fourteen VUSs, nine seemed to show a tendency for a potential deleterious role (64.3%) and two a tendency for being not-deleterious (14.3%). In 2019, the last year included in our study, two VUSs showed a tendency toward LP (33.33%). The remaining four VUSs showed a tendency for a potential deleterious role (VUS-LP). Regarding the type of variant, most of those previously classified as VUSs that nowadays showed a tendency to increase their deleterious role to LP were missense (4.8%) and nonsense (3.2%). A group of sixty-seven variants (forty-eight missense, ten indels, seven nonsense and two intronic) showed a tendency to be deleterious (VUS-LP) after applying our algorithm (Tables 1 and 2; Figures 1 and 2).

Additionally, we performed an exhaustive analysis focused on *TTN*, the major gene currently associated with DCM. We identified that 3 of 81 rare variants changed from VUS to LB (3.7%). These three variants were missense and were previously classified in 2016. Three more rare variants upgraded to LP, which were all nonsense. After applying our algorithm to the remaining 75 VUSs, 22 (29.33%) showed a tendency to not be deleterious (VUS-LB), 20 of which were missense and 2 intronic, and 43 (57.33%) seemed to have a potential deleterious role despite not being confirmed (VUS-LP), of which thirty-one were missense, six nonsense, four indels, and two intronic. Concerning the proportion of potential pathogenicity, indels and nonsense showed high levels (100% and 90%, respectively), whereas missense and intronic showed medium rates (63.49% and 50%, respectively) (Tables 1 and 2; Figures 1 and 2).

Finally, we identified ten patients harboring an LP variant (six harboring only an LP variant and four more harboring one LP variant plus at least one VUS-LP). All these deleterious variants were located in *LMNA* (one variant), *MYH7* (three variants), *RBM20* (one variant), *TNNT2* (one variant), and *TTN* (six variants) genes. Our algorithm showed that 44 patients carried at least one rare variant classified as VUS-LP. A total of sixty-three variants with a highly potential deleterious role were identified (forty-four missense, eleven indels, seven nonsense, and one intronic). These rare variants with a potential deleterious role were located in the same genes abovementioned, as well as *BAG3*, *DES*, *DSP*, *FLNC*, *JPH2*, *SCN5A*, *TNNC1*, and *VCL* (Tables 1 and 2; Figure 2).

3. Discussion

In the era of precision medicine, conclusive molecular genetic tests inform diagnoses, prognoses, and risk assessments for patients and their relatives in G-DCM [1]. The use of current ACMG recommendations helps to obtain a classification of rare variants [6]. However, an implicit stringent variant adjudication approach and a lack of sufficient scientific data, or available but controversial data, lead to many rare variants remaining categorized as VUSs. This ambiguous role does not provide conclusive data on the cause of disease and cannot be disregarded [5]. Continuous data improvement may modify a previous ambiguous classification, helping to gain certainty and, therefore, playing an actionable clinical role [2]. This fact highlights the importance of periodic reanalysis of

VUS, at least in a timeframe from 2 to 5 years, as suggested by our group in previous studies [10,15,17,20]. Therefore, revising and clarifying the roles of VUSs is necessary for obtaining a comprehensive diagnosis [5]. In G-DCM, a sole study focused on variant reevaluation has been published to date, showing a near 30% decrease in ambiguity in VUS classified more than 10 years ago and without following ACMG recommendations [18]. A high percentage of reclassification suggests an immediate update of variants classified not following current ACMG recommendations, as already suggested by our group [10]. Another study showed a reduction in VUSs using analyses including only genes with a definitive-MCD association [19], demonstrating that the prior choice of genes to study is a key point, in our view, before performing a genetic analysis. Our study moved one step forward and designed an easy-to-use algorithm, helping to unravel the tendency of VUSs in G-DCM.

In our study, 12% of VUSs definitively modified their first classification, helping, thus, to clarify their role in G-DCM. This modification has been performed mainly by updating population frequencies; a simple and quick action. We suggest that it should be mandatory at least to update MAF periodically in public databases. We identified that 4% of VUSs decreased their ambiguous roles to benign. In concordance with previous studies, reducing the ambiguity of a VUS is an important advantage of a comprehensive reanalysis because these VUSs can be disregarded as the main cause of disease in each patient [17,20]. The 8% of VUSs increased the pathogenic potential to LP in G-DCM due to the reduction in MAF and, in a few cases, additional functional data since the first classification. All these variants are located in genes with a current definite/strong association with DCM [2]. However, no family segregation data were available in our study, impeding a conclusive translation into families. At this point, it is important to highlight the necessity of performing comprehensive large family correlation analysis to gain certainty. Another main item is functional studies. The use of this basic approach can help to unravel the pathophysiological mechanism of a rare variant, helping to conclude a definite pathogenic role. In recent years, the use of iPSC-derived cardiomyocytes, especially, has allowed researchers to demonstrate the molecular and cellular pathways involved in the pathogenicity of a rare variant. Both kinds of studies are crucial to help with clinical diagnosis, due to the fact that patients harboring a deleterious variant in any cardiomyopathy-associated gene showed a higher risk of mortality and a significantly increased risk of developing cardiomyopathy [7,8].

We identified that most of the rare variants remain classified as VUSs to date, following the current ACMG recommendations. This implies no impact on clinical management [1]. However, a recent study suggests that a VUS in a robust DCM-associated gene is associated with an adverse prognosis [21]. To shed light on the ambiguity implicit in VUSs, subgroups were categorized according to the abovementioned algorithm (please see methods section) already used in other inherited arrhythmogenic diseases [17,20], but now explicit for G-DCM, according to definite gene–disease association, lack of data or available contradictory data, and extremely rare population frequencies. Despite already being published, we suggest the additional use of our algorithm in other centers, and large cohorts in order to corroborate proper VUS subclassification. Hence, of the 110 rare variants that remain as VUSs after reclassification following the ACMG recommendations, 60.90% increase their potential pathogenic role (VUS-LP), 14.54% remain as VUSs, and 24.54% potentially decrease their ambiguous role (VUS-LB). It is important to remark that despite a tendency toward a benign or deleterious role in G-DCM, all these variants remain as VUSs and no clinical translation and adoption of therapeutic measures should be performed [1,2]. Unfortunately, for the VUS analyzed in our study, neither a complete family segregation nor a functional analysis is currently available, impeding a conclusive role following the current ACMG recommendations. It is important to mention a recent study suggesting that a VUS can be associated with an increased risk of cardiac mortality and heart failure hospitalization, especially those VUSs located in definite genes (*ACTC1*, *BAG3*, *DSP*, *FLNC*, *LMNA*, *MYH7*, *NEXN*, *PLN*, *RBM20*, *TNNC1*, *TNNT2*, *TPM1*, *TTN*, and *VCL*) [21]. In our

study, 94.02% of reclassified VUS-LP variants were located in any of these genes with a robust association with G-DCM, supporting a potential deleterious role and suggesting a close follow-up of patients harboring any of these variants.

The reinterpreted variants were previously classified in different years, from 2016 to 2019, both inclusive. The percentage of reclassified variants was higher in 2016 than in 2019, in concordance with studies published several years ago in the field of reclassification of VUS associated with inherited arrhythmogenic syndromes [10,15,17,20]. This is mainly due to the constant updating of population frequencies, which allows us to have more precise data that brings us closer to being able to classify the variants more precisely, as occurred in previous studies [15,17,20]. Therefore, the number of variants remaining steady as the number of VUSs decreases constantly in comparison to previous years and, for this reason, the percentage of variants reclassified in 2019 was lower than in 2016, at least in our study, which is also in concordance with previous studies of our group in other inherited arrhythmogenic syndromes [15,17,20]. In this way, while being focused on updating population frequencies, the algorithm we propose also allows us to observe that VUSs with a tendency to be deleterious are increasingly classified today, while more variants with a tendency to have a genetic background without a main causative role can be ruled out. In G-DCM, we observed this pattern with a smaller number of VUSs each year, as we move closer to the present. In addition, and following specific algorithms for unravelling the role of VUSs in each disease, their classification is more precise, with a tendency to be deleterious, as reported in other inherited arrhythmogenic diseases [15,17,20]. It is important to mention that obtaining precise classifications occurs mainly due to updates in population frequencies, without including functional studies or genotype-phenotype correlations of large families for more than three generations. Despite these limitations, as already mentioned, the inclusion of these additional studies is necessary to be able to conclude a definitive pathogenic role in these rare variants in G-DCM [1,5].

Finally, it is important to remark that most of deleterious or potentially deleterious variants were identified in the *TTN* gene, the main gene associated with G-DCM in adult and pediatric population. Re-evaluation was also higher in *TNNT2*, *RBM20*, *MYH7*, and *LMNA*, in concordance with reports related to aggressive phenotypes, especially in the pediatric population [22,23]. Therefore, if a variant is re-analyzed in a pediatric patient, it should be also taken into account. Focused on *TTN*, the major gene currently associated with DCM [1,2], despite this ratio being based mainly on radical variants (nonsense, indels. . .) [24]. Most of the reported VUSs in the *TTN* gene are missense [25], as observed in our study. The role of *TTN* missense variants in G-DCM has been difficult to elucidate because of a lack of data concerning this gene, which encodes the largest protein in the human body and is associated with several skeletal muscular diseases [26]. This lack of data impedes a conclusive classification of most rare variants, clarifying a definite role of only three missense variants to LB and three nonsense variants to LP. After applying our specific algorithm for G-DCM, and updating only population frequencies, practically all nonsense and indel variants increased their potential deleterious role to VUS-LP in contrast to nearly 50% of intronic and missense VUSs. We moves one step forward in the prediction of missense VUS in *TTN*, contrary to a study suggesting that *TTN* missense variants should be classified as likely benign due to lack of data [27]. Our approach suggests a tendency for a potential deleterious role, but it is necessary to include functional and large family segregation studies to clarify the role of missense variants in *TTN*, according to a recent study [28]. For this reason, we suggest that the adoption of measures based on missense variants in *TTN* should be undertaken with caution and in a personalized way.

There are some limitations to mention. The reclassification and reinterpretation of rare genetic variants in our cohort have important limitations. Firstly, all cases included in our cohort may carry additional rare variants in other genes not included in our panel. However, we have analyzed all genes currently associated with G-DCM. In addition, a lack of available functional data for most rare variants impedes a more accurate interpretation. In this same way, a lack of family segregation, which is also crucial to clarify the role of a

rare variant, in our view, is a key point to finally conclude the potential deleterious role of a rare variant. To support our results, reclassifications/reinterpretations of all variants should be corroborated in additional larger cohorts of G-DCM patients, to clarify their potential actionable role in clinical practice. At this point, it is important to take into account the ethnicity of the patient, due to genetic differences from diverse ancestries, to guide testing interpretation [29]. Finally, who should assume to perform the reclassification/reinterpretation and the implicit economic cost are controversial points not assessed in our study.

4. Materials and Methods

4.1. Study Cohort

Our retrospective study included 65 patients (all adults, >18 years old; mean age: 43.2 years old; 61.23% men; all Caucasian) with a definitive clinical diagnosis of DCM, determined following the available clinical guidelines [1,30,31]. Suspected cases with an inconclusive diagnosis were not included, to avoid bias in the reclassification of genetic variants.

All patients were genetically analyzed (please see Section 4.2). All patients included in our study carried at least one rare variant classified as a VUS, according to the ACMG recommendations [6].

4.2. Genetic Analysis

Genetic analysis was approved by the Ethics Committee of Hospital Josep Trueta (Girona, Catalonia, Spain), following the World Medical Association Declaration of Helsinki. Clinical and genetic data on all the patients were anonymized and kept confidential. Written informed consent was obtained from all the patients before genetic analysis.

A resequencing custom-made panel included all the main genes associated with G-DCM [2,5] (*ACTC1*, *ACTN2*, *BAG3*, *DES*, *DSP*, *FLNC*, *JPH2*, *LMNA*, *MYH7*, *NEXN*, *PLN*, *RBM20*, *SCN5A*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TTN*, and *VCL*). Isoforms of all the genes are described in Ensembl 75 (www.ensembl.org/), linked to a RefSeq code (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) or CCDS (www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/). The bioinformatic analysis included adaptor and low-quality base trimming of the FASTQ files. GEM III was used for map-trimmed reads. The output was sorted, and uniquely and properly mapped read pairs were selected. SAMtools v1.2 was used for variant calling from the cleaned BAM files. The final annotation steps provided information included in public databases. Rare genetic variants (with a minor allele frequency—MAF—of <1%) were confirmed by Sanger sequencing. The exons and exon–intron boundaries of each gene were amplified in both directions.

The SeqScape v2.7 software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) was used to reanalyze all sequences obtained. No new rare variants were identified in any of the analyzed genes. The original classification compared rare variants with DNA sequences from 350 healthy Spanish individuals (individuals not related to any index case and of the same ethnicity) as control cases. Sequence variants were described following the Human Genome Variation Society (HGVS) rules (www.hgvs.org/). Currently, all rare variants in any of the genes analyzed were contrasted in the Genome Aggregation Database (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). All rare variants were also consulted in ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/), VarSome (www.versome.com/), CardioClassifier (www.cardioclassifier.org/), InterVar (<https://wintervar.wglab.org/>), and CardioVAI (<https://cardiovai.engenome.com/>).

4.3. Data Sources

An exhaustive review of the available data on each rare variant was performed independently by five authors; subsequently, the reviews were compared and verified. Data were collected from the Human Gene Mutation Database (HGMD) (www.hgmd.org), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>), the National Center for Biotechnology Information single-nucleotide polymorphism (SNP) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>),

Google Scholar (<https://www.scholar.google.com>), Springer Link (<https://www.springer.com>), and Science Direct (www.sciencedirect.com).

4.4. Classification/Interpretation

From 2016 to 2019, all rare variants in genes associated with DCM were classified according to the ACMG recommendations [6]. Now, the same rare variants have also been reclassified and the same ACMG recommendations also followed, but updates are included: the PM2 item was considered fulfilled if the MAF in the relevant population databases was $\leq 0.01\%$ [32]. In addition, all reported deleterious variants currently classified as definitively pathogenic in IASs following ACMG recommendations are very rare (MAF $< 0.005\%$) [33]. Other recent updates, according to gene-specific [34] and disease-specific associations, have also been taken into account [35,36]. The final classification of a rare variant as a VUS may be due to a lack of data or incongruences in the available data [37,38]. The current prevalence for familial DCM is approximately 1/2500 (MAF: 0.04%). Taking into account these two items, we propose a subclassification of VUSs into three subgroups: VUS-LB, VUS-LP, or remaining VUS (please see Figure 3). The first point is a definite gene-association with DCM (*ACTC1*, *ACTN2*, *BAG3*, *DES*, *DSP*, *FLNC*, *JPH2*, *LMNA*, *MYH7*, *NEXN*, *PLN*, *RBM20*, *SCN5A*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TTN*, and *VCL*) [2]. Then, the existence or not of data (if available, contradictory data). Finally, the use of the MAF (prevalence of familial DCM is the threshold), being very low ($< 0.005\%$ or no MAF), low ($> 0.005\%$ and $< 0.04\%$), or medium ($> 0.04\%$). We have already implemented this approach in previously published manuscripts focused on other IAS [16,20,21]. Genetic data were independently evaluated and classified by five authors, who are specialists in the genetics of inherited arrhythmias, to avoid bias. All investigators agreed on the final classification of all the rare variants included in our study.

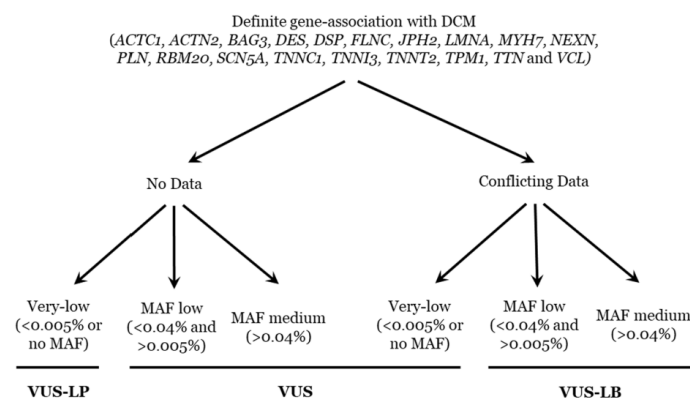


Figure 3. Algorithm of classification for VUS. MAF: minor allele frequency. VUS: variant of unknown significance. VUS-LP: variant of unknown significance—likely pathogenic. VUS-LB: variant of unknown significance—likely benign.

5. Conclusions

In summary, a definite genetic diagnosis of rare variants related to G-DCM has actionable consequences for patients and their relatives. This emphasizes the importance of cautious genetic interpretation of variants and highlights the necessity of periodic reclassification/reinterpretation if a variant remains as a VUS, at least once every five years. Part of VUS clarifies its function after an update of population frequencies; a simple, cheap, and fast action. Due to a lack of functional studies as well as comprehensive clinical studies of large familial cases, most rare variants remain as VUSs in G-DCM following the stringent criteria suggested in ACMG recommendations. Identifying a deleterious or benevolent

tendency of a VUS help with follow-up patients and their relatives despite no clinically actionable, so far. We propose a specific algorithm to help the interpretation of VUSs in G-DCM.

Author Contributions: O.C., G.S.-B., J.B. and R.B. developed the concept. A.P.-S., E.M.-B., O.C., A.F.-P., M.C., A.I., S.C., E.A., M.P., M.A., B.d.O., L.L., F.P., C.T.d.L., A.M., R.T. and G.S.-B. acquired, pre-processed, and analyzed the data. A.P.-S., O.C., R.T. and G.S.-B. prepared the manuscript. O.C., R.T. and R.B. supervised the study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Obra Social “La Caixa Foundation” (LCF/PR/GN16/50290001 and LCF/PR/GN19/50320002). Co-funded by Instituto de Salud Carlos III (FIS PI16/01203 and FIS PI21/00094) and by ERDF/ESF, “Investing in Your Future” and Fundació La Marató TV3 (245/U/2020). CIBERCV is an initiative of the ISCIII, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. IDIBGI is a “CERCA Programme/Generalitat de Catalunya”. The funders played no role in study design, data collection, data analysis, interpretation, or writing of the report.

Institutional Review Board Statement: The analysis was approved by the ethics committee of Hospital Josep Trueta (Girona, Catalonia, Spain, Approval Code: CEiM2012097) according to the World Medical Association Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients before genetic analysis.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data are included in the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Arbelo, E.; Protonotarios, A.; Gimeno, J.R.; Arbustini, E.; Barriales-Villa, R.; Basso, C.; Bezzina, C.R.; Biagini, E.; A Blom, N.; A de Boer, R.; et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur. Heart J.* **2023**, *44*, 3503–3626. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Wilde, A.A.M.; Semsarian, C.; Marquez, M.F.; Shamloo, A.S.; Ackerman, M.J.; Ashley, E.A.; Sternick, E.B.; Barajas-Martinez, H.; Behr, E.R.; Bezzina, C.R.; et al. European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for Cardiac Diseases. *Europace* **2022**, *24*, 1307–1367. [\[CrossRef\]](#)
3. Muller, R.D.; McDonald, T.; Pope, K.; Cragun, D. Evaluation of Clinical Practices Related to Variants of Uncertain Significance Results in Inherited Cardiac Arrhythmia and Inherited Cardiomyopathy Genes. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2020**, *13*, e002789. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Jordan, E.; Peterson, L.; Ai, T.; Asatryan, B.; Bronicki, L.; Brown, E.; Celeghin, R.; Edwards, M.; Fan, J.; Ingles, J.; et al. An Evidence-Based Assessment of Genes in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **2021**, *144*, 7–19. [\[CrossRef\]](#)
5. Landstrom, A.P.; Chahal, A.A.; Ackerman, M.J.; Cresci, S.; Milewicz, D.M.; Morris, A.A.; Sarquella-Brugada, G.; Semsarian, C.; Shah, S.H.; Sturm, A.C.; et al. Interpreting Incidentally Identified Variants in Genes Associated with Heritable Cardiovascular Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2023**, *16*, e000092. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [\[CrossRef\]](#)
7. Asatryan, B.; Shah, R.A.; Sharaf Dabbagh, G.; Landstrom, A.P.; Darbar, D.; Khanji, M.Y.; Lopes, L.R.; van Duijvenboden, S.; Muser, D.; Lee, A.M.; et al. Predicted Deleterious Variants in Cardiomyopathy Genes Prognosticate Mortality and Composite Outcomes in UK Biobank. *JACC Heart Fail.* **2023**. *ahead of print.* [\[CrossRef\]](#)
8. Hofmeyer, M.; Haas, G.J.; Jordan, E.; Cao, J.; Kransdorf, E.; Ewald, G.A.; Morris, A.A.; Owens, A.; Lowes, B.; Stoller, D.; et al. Rare Variant Genetics and Dilated Cardiomyopathy Severity: The DCM Precision Medicine Study. *Circulation* **2023**, *148*, 872–881. [\[CrossRef\]](#)
9. Stroeck, S.; Verdonchot, J.A.J. The next step toward personalized recommendations for genetic cardiomyopathies. *Eur. J. Hum. Genet.* **2023**, *31*, 1201–1203. [\[CrossRef\]](#)
10. Campuzano, O.; Sarquella-Brugada, G.; Fernandez-Falgueras, A.; Coll, M.; Iglesias, A.; Ferrer-Costa, C.; Cesar, S.; Arbelo, E.; García-Álvarez, A.; Jordà, P.; et al. Reanalysis and reclassification of rare genetic variants associated with inherited arrhythmic syndromes. *EBioMedicine* **2020**, *54*, 102732. [\[CrossRef\]](#)

11. Towbin, J.A.; McKenna, W.J.; Abrams, D.J.; Ackerman, M.J.; Calkins, H.; Darrieux, F.C.C.; Daubert, J.P.; de Chillou, C.; DePasquale, E.C.; Desai, M.Y.; et al. 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Heart Rhythm* **2019**, *16*, e301–e372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Hershberger, R.E.; Givertz, M.M.; Ho, C.Y.; Judge, D.P.; Kantor, P.F.; McBride, K.L.; Morales, A.; Taylor, M.R.G.; Vatta, M.; Ware, S.M.; et al. Genetic evaluation of cardiomyopathy: A clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet. Med.* **2018**, *20*, 899–909. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Musunuru, K.; Hershberger, R.E.; Day, S.M.; Klinedinst, N.J.; Landstrom, A.P.; Parikh, V.N.; Prakash, S.; Semsarian, C.; Sturm, A.C.; on behalf of the American Heart Association Council on Genomic and Precision Medicine; et al. Genetic Testing for Inherited Cardiovascular Diseases: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2020**, *13*, e000067. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Stiles, M.K.; Wilde, A.A.; Abrams, D.J.; Ackerman, M.J.; Albert, C.M.; Behr, E.R.; Chugh, S.S.; Cornel, M.C.; Gardner, K.; Ingles, J.; et al. 2020 APHRS/HRS expert consensus statement on the investigation of decedents with sudden unexplained death and patients with sudden cardiac arrest, and of their families. *Heart Rhythm* **2021**, *18*, e1–e50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sarquella-Brugada, G.; Fernandez-Falgueras, A.; Cesar, S.; Arbelo, E.; Coll, M.; Perez-Serra, A.; Puigmulé, M.; Iglesias, A.; Alcalde, M.; Vallverdú-Prats, M.; et al. Clinical impact of rare variants associated with inherited channelopathies: A 5-year update. *Hum. Genet.* **2022**, *141*, 1579–1589. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Bennett, J.S.; Bernhardt, M.; McBride, K.L.; Reshmi, S.C.; Zmuda, E.; Kertesz, N.J.; Garg, V.; Fitzgerald-Butt, S.; Kamp, A.N. Reclassification of Variants of Uncertain Significance in Children with Inherited Arrhythmia Syndromes is Predicted by Clinical Factors. *Pediatr. Cardiol.* **2019**, *40*, 1679–1687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Vallverdú-Prats, M.; Alcalde, M.; Sarquella-Brugada, G.; Cesar, S.; Arbelo, E.; Fernandez-Falgueras, A.; Coll, M.; Pérez-Serra, A.; Puigmulé, M.; Iglesias, A.; et al. Rare Variants Associated with Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Reclassification Five Years Later. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Quiat, D.; Witkowski, L.; Zouk, H.; Daly, K.P.; Roberts, A.E. Retrospective Analysis of Clinical Genetic Testing in Pediatric Primary Dilated Cardiomyopathy: Testing Outcomes and the Effects of Variant Reclassification. *J. Am. Heart Assoc.* **2020**, *9*, e016195. [\[CrossRef\]](#)
19. Stroeks, S.; Hellebrekers, D.; Claes, G.R.F.; Tayal, U.; Krapels, I.P.C.; Vanhoutte, E.K.; van den Wijngaard, A.; Henkens, M.T.H.M.; Ware, J.S.; Heymans, S.R.B.; et al. Clinical impact of re-evaluating genes and variants implicated in dilated cardiomyopathy. *Genet. Med.* **2021**, *23*, 2186–2193. [\[CrossRef\]](#)
20. Martínez-Barrios, E.; Sarquella-Brugada, G.; Pérez-Serra, A.; Fernández-Falgueras, A.; Cesar, S.; Coll, M.; Puigmulé, M.; Iglesias, A.; Alcalde, M.; Vallverdú-Prats, M.; et al. Discerning the Ambiguous Role of Missense *TTN* Variants in Inherited Arrhythmogenic Syndromes. *J. Pers. Med.* **2022**, *12*, 241. [\[CrossRef\]](#)
21. Martínez-Barrios, E.; Sarquella-Brugada, G.; Perez-Serra, A.; Fernandez-Falgueras, A.; Cesar, S.; Alcalde, M.; Coll, M.; Puigmulé, M.; Iglesias, A.; Ferrer-Costa, C.; et al. Reevaluation of ambiguous genetic variants in sudden unexplained deaths of a young cohort. *Int. J. Leg. Med.* **2023**, *137*, 345–351. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Ware, S.M.; Bhatnagar, S.; Dexheimer, P.J.; Wilkinson, J.D.; Sridhar, A.; Fan, X.; Shen, Y.; Tariq, M.; Schubert, J.A.; Colan, S.D.; et al. The genetic architecture of pediatric cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2022**, *109*, 282–298. [\[CrossRef\]](#)
23. Stroeks, S.L.V.M.; Hellebrekers, D.; Claes, G.R.F.; Krapels, I.P.C.; Henkens, M.H.T.M.; Sicking, M.; Vanhoutte, E.K.; Eenden, A.H.-V.D.; Brunner, H.G.; Wijngaard, A.v.D.; et al. Diagnostic and prognostic relevance of using large gene panels in the genetic testing of patients with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* **2023**, *31*, 776–783. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. McAfee, Q.; Chen, C.Y.; Yang, Y.; Caporizzo, M.A.; Morley, M.; Babu, A.; Jeong, S.; Brandimarto, J.; Bedijr, K.C.; Flam, E.; et al. Truncated titin proteins in dilated cardiomyopathy. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabd7287. [\[CrossRef\]](#)
25. Begay, R.L.; Graw, S.; Sinagra, G.; Merlo, M.; Slavov, D.; Gowan, K.; Jones, K.L.; Barbat, G.; Spezzacatene, A.; Brun, F.; et al. Role of Titin Missense Variants in Dilated Cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e002645. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Rich, K.A.; Moscarello, T.; Siskind, C.; Brock, G.; Tan, C.A.; Vatta, M.; Winder, T.L.; Elsheikh, B.; Vicini, L.; Tucker, B.; et al. Novel heterozygous truncating titin variants affecting the A-band are associated with cardiomyopathy and myopathy/muscular dystrophy. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2020**, *8*, e1460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Akinrinade, O.; Heliö, T.; Deprez, R.H.L.; Jongbloed, J.D.H.; Boven, L.G.; Berg, M.P.v.D.; Pinto, Y.M.; Alastalo, T.-P.; Myllykangas, S.; van Spaendonck-Zwarts, K.; et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4093. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Domínguez, F.; Lalaguna, L.; Martínez-Martín, I.; Piqueras-Flores, J.; Rasmussen, T.B.; Zorio, E.; Giovinazzo, G.; Prados, B.; Ochoa, J.P.; Bornstein, B.; et al. Titin Missense Variants as a Cause of Familial Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **2023**, *147*, 1711–1713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Rosamilia, M.B.; Markunas, A.M.; Kishnani, P.S.; Landstrom, A.P. Underrepresentation of Diverse Ancestries Drives Uncertainty in Genetic Variants Found in Cardiomyopathy-Associated Genes. *JACC* **2024**, *3*, 100767. [\[CrossRef\]](#)
30. Priori, S.G.; Blomstrom-Lundqvist, C. 2015 European Society of Cardiology Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death summarized by co-chairs. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 2757–2759. [\[CrossRef\]](#)
31. Al-Khatib, S.M.; Stevenson, W.G.; Ackerman, M.J.; Bryant, W.J.; Callans, D.J.; Curtis, A.B.; Deal, B.J.; Dickfeld, T.; Field, M.E.; Fonarow, G.C.; et al. 2017 AHA/ACC/HRS guideline for management of patients with ventricular arrhythmias and the

- prevention of sudden cardiac death: Executive summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *Heart Rhythm* **2018**, *15*, e190–e252. [\[PubMed\]](#)
32. Kobayashi, Y.; Yang, S.; Nykamp, K.; Garcia, J.; Lincoln, S.E.; Topper, S.E. Pathogenic variant burden in the ExAC database: An empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. *Genome Med.* **2017**, *9*, 13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 33. Jordan, D.M.; Kiezun, A.; Baxter, S.M.; Agarwala, V.; Green, R.C.; Murray, M.F.; Pugh, T.; Lebo, M.S.; Rehm, H.L.; Funke, B.H.; et al. Development and validation of a computational method for assessment of missense variants in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *88*, 183–192. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 34. Kelly, M.A.; Caleshu, C.; Morales, A.; Buchan, J.; Wolf, Z.; Harrison, S.M.; Cook, S.; Dillon, M.W.; Garcia, J.; Haverfield, E.; et al. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: Recommendations by ClinGen’s Inherited Cardiomyopathy Expert Panel. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 351–359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 35. Bains, S.; Dotzler, S.M.; Krijger, C.; Giudicessi, J.R.; Ye, D.; Bikker, H.; Rohatgi, R.K.; Tester, D.J.; Bos, J.M.; Wilde, A.A.; et al. A phenotype-enhanced variant classification framework to decrease the burden of missense variants of uncertain significance in type 1 long QT syndrome. *Heart Rhythm* **2022**, *19*, 435–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 36. Giudicessi, J.R.; Lieve, K.V.V.; Rohatgi, R.K.; Koca, F.; Tester, D.J.; van der Werf, C.; Martijn Bos, J.; Wilde, A.A.M.; Ackerman, M.J. Assessment and Validation of a Phenotype-Enhanced Variant Classification Framework to Promote or Demote RYR2 Missense Variants of Uncertain Significance. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2019**, *12*, e002510. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 37. Arbustini, E.; Behr, E.R.; Carrier, L.; van Duijn, C.; Evans, P.; Favalli, V.; van der Harst, P.; Haugaa, K.H.; Jondeau, G.; Käåb, S.; et al. Interpretation and actionability of genetic variants in cardiomyopathies: A position statement from the European Society of Cardiology Council on cardiovascular genomics. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 1901–1916. [\[CrossRef\]](#)
 38. Arbustini, E.; Urtis, M.; Elliott, P. Interpretation of genetic variants depends on a clinically guided integration of phenotype and molecular data. *Eur. Heart J.* **2022**, *43*, 2638–2639. [\[CrossRef\]](#)

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.

18 DISCUSIÓN

18.1 ARTÍCULO 1. MIRNAS CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES PARA LA DETECCIÓN DE INTOLERANTES A ESTATINAS.

Las guías de práctica clínica que establecen los objetivos para la reducción de los factores de riesgo cardiovascular, entre ellos los niveles de lípidos en la sangre (especialmente los niveles de LDLc y triglicéridos), y de mayor aplicación para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares recomiendan las estatinas. Sus beneficios han sido ampliamente demostrados [30][39][290]. Aunque generalmente se toleran bien, las tasas de abandono y falta de adherencia son elevadas después del primer año de tratamiento [292]. La principal causa de abandono son sus efectos adversos, sobre todo a nivel muscular [293]. Esta elevada tasa de abandono terapéutico conduce a un incremento de la morbilidad y mortalidad cardiovascular [59][294]. Identificar a los pacientes que presentan intolerancia a las estatinas es primordial para evitar el riesgo cardiovascular y alcanzar los objetivos de LDLc establecidos por las guías [39]. El impacto negativo por el abandono del uso de estatinas secundario a efectos adversos conduce la reducción de la prevención secundaria cardiovascular con empeoramiento de la aterosclerosis a lo largo de los años. Hasta la fecha, no existen protocolos a nivel clínico, diagnóstico, ni biomarcadores que permitan sospechar quienes presentaran esta condición.

El síndrome muscular asociado a estatinas incluye varias presentaciones, siendo la mialgia es uno de los fenotipos más comunes [48][65][295]. A nivel molecular existen diferentes vías patológicas que podrían explicar la toxicidad de las estatinas y su relación directa con el dolor muscular. Entre ellas se han barajado la disfunción mitocondrial a través de la deficiencia de coenzima Q10, la reducción de la beta-oxidación de los ácidos grasos o la promoción de la apoptosis muscular. Así, se ha propuesto que influyen la interacción fármaco-fármaco, el ejercicio o ciertos polimorfismos genéticos [293]. Si bien se desconoce el proceso biológico que subyace en el síndrome muscular asociado a estatinas; ello limita las medidas preventivas.

La dificultad para alcanzar un diagnóstico clínico, la falta de marcadores moleculares o pruebas no invasivas para detectar los efectos adversos secundarios de las estatinas y el impacto sobre el abandono de la terapia preventiva hacen necesario

encontrar una herramienta que permita identificar a los pacientes que potencialmente presentarán efectos adversos a este tratamiento. Algunos grupos han relacionado los miRNAs con la eficacia de diferentes estatinas y su efecto pleiotrópico sobre las células endoteliales [296][297][298][299]. Hasta la fecha, el uso de miRNAs circulantes como herramienta diagnóstica para la detección de individuos IE permanece inexplorado.

Nuestro estudio identificó cinco miRNAs plasmáticos (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) sobreexpresados en pacientes con IE en comparación con el grupo de pacientes NIE, todos ellos de elevado o muy elevado riesgo cardiovascular. Cuando se exploraron las vías biológicas de estos miRNAs se observa que let-7c-5p interviene en la atenuación muscular a través del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , *transforming growth factor beta*). Su efector intracelular Smad3 inhibe la miogénesis y estimula la adipogénesis y la acumulación de lípidos en miofibras [300][301]. El let-7f-5p, regulado por la familia de factores de transcripción FoxO, se presenta sobreexpresado en la miastenia *gravis* con anticuerpos tirosina quinasa específicos del músculo en individuos seropositivos [302]. La miastenia *gravis* es una enfermedad autoinmune neuromuscular causada por anticuerpos que atacan a los receptores en la unión neuromuscular. Por último, el miR-376a-3p se ha relacionado con enfermedades de las arterias coronarias. Actúa mediante la proteína 1 que interactúa con el receptor nuclear, lo que conduce a la apoptosis celular. Por lo tanto, miR-376a-3p podría estar vinculado, por esta vía con el efecto de las estatinas en la reducción del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias [303].

Otros miRNAs han sido previamente descritos en relación a la toxicidad de las estatinas son miR-499 y miR-145 [304]. En 2016, Min et al., utilizando modelos combinados, *in vivo* e *in vitro*, demostraron una sobreexpresión de miR-499-5p relacionada con lesiones musculares durante el ejercicio cuando la contracción muscular inducida por carbacol se combina con la ingesta de estatinas. Los niveles circulantes de miR-1, miR-133a y miR-206 aumentaron significativamente en pacientes en tratamiento con estatinas que practicaban deportes de resistencia y mostraron efectos adversos musculares [305]. Fu et al. demostraron la lesión inducida por estatinas en el músculo esquelético a través de la sobreexpresión de

miR-1a mediante la regulación de la vía de la quinasa 1 activada por mitógenos [306]. También existen modelos animales donde se ha demostrado que el ejercicio moderado y gradual puede tener un papel beneficioso en la ingesta de estatinas y su impacto en el músculo esquelético [307][308]. El proceso de diferenciación y especialización celular de los cardiomiocitos necesita de unas condiciones fisiológicas y moleculares concretas que podrían verse afectadas por las estatinas.

Posteriormente, se usó la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* y *Gene Ontology* para analizar la función biológica y los posibles procesos metabólicos asociados a los miRNAs seleccionados. Así, cuatro de los 5 miRNAs sobreexpresados (let-7c-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) interactúan para regular los genes *POTEG*, *BEND4*, *CASTOR2* y *POTEM* (Figura 9). Estos genes están directamente relacionados con la homeostasis muscular y los procesos apoptóticos. *CASTOR2* es uno de los genes que ha sido descrito como una diana de la vía proteolítica de FoxO que conduce a la atrofia muscular [309]. FoxO, es una familia de factores de transcripción, implicados en la degradación de proteínas y la apoptosis. Se han relacionado con la atrofia muscular y la caquexia con el uso de ciertos tratamientos de quimioterapia a través de las vías IGF1/AKT/FoxO [310]. Cuatro de los 5 miRNAs sobreexpresados (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p y miR-376c-3p) interactúan con el gen *TGFβR1* la expresión del cual está relacionada con el crecimiento y la diferenciación muscular [311]. La señalización de TGFβ desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento y la atrofia muscular tanto en miopatías heredadas como adquiridas [312]. Por último, se identificó el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1) como un gen objetivo compartido por los cinco miRNAs. Esto se confirma los estudios que apoyan que las estatinas regulan la señalización de IGF1-R en diferentes niveles [313][314][315] AKT es un regulador clave de la síntesis y degradación del crecimiento y la regeneración muscular a través de los factores de transcripción AKT/mTOR y FoxO [316]. El IGF1 está relacionado con la miotoxicidad de las estatinas al inhibir la vía IGF1/AKT, lo que conduce a una mayor degradación de las proteínas miofibrilares y una alteración de la síntesis de proteínas. De este modo, las estatinas inhiben la fosforilación de AKT, activan la cascada de caspasas y PAPR, induciendo apoptosis; ello está estrechamente asociada con la inhibición de la síntesis de colesterol a nivel de la

hidroximetilglutaril-CoA (HMG)-CoA reductasa. Estas vías de miotoxicidad inducida por estatinas se han contrastado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [316].

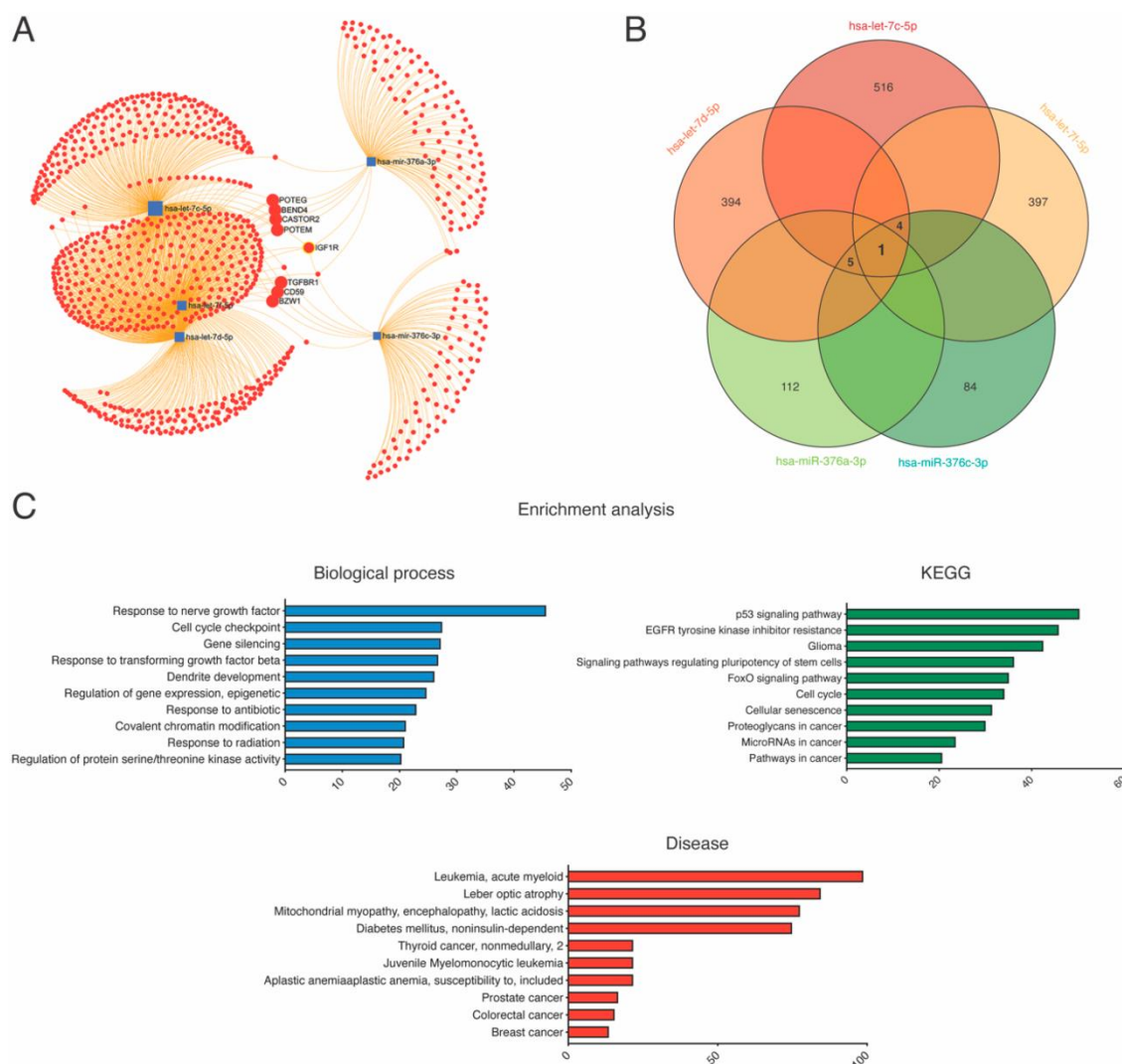


Figura 9. Análisis KEGG y GO de miRNA expresados diferencialmente. (A) Red de genes de miRNA para let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. (B) Diagrama de Venn que muestra la superposición de objetivos genéticos de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. (C) Análisis de enriquecimiento funcional GO y KEGG de let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p. Imagen tomada de *Mangas Int J Mol Sci. 2022* [317].

Con el análisis mediante *Gene Ontology* se observó una mayor relación entre los 5 miRNAs sobreexpresados y enfermedades relacionadas con la miopatía mitocondrial. Estudios que han demostrado que las mitocondrias desempeñan un

papel importante en las miopatías inducidas por estatinas apoyan esta vía molecular. Está establecido que las estatinas pueden tener impacto sobre la función mitocondrial, y algunos de sus efectos adversos podrían estar mediados a través de vías mitocondriales [318][319][320]. Por ello, los resultados obtenidos sugieren que estos miRNAs circulantes podrían estar involucrados en los mecanismos de acción de las estatinas sobre la función mitocondrial.

Respecto a su capacidad diagnóstica, nuestros resultados demuestran que los 5 miRNAs seleccionados generan un mejor rendimiento predictivo sobre los pacientes de elevado riesgo cardiovascular y con IE que utilizando cada miRNA por separado. Estos miRNAs no habían sido asociados a la intolerancia a estos medicamentos hasta la fecha (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación del valor diagnóstico potencial de los miRNA expresados diferencialmente y el panel de 5 miRNA (let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p) como biomarcadores para categorizar a los pacientes intolerantes a las estatinas. AUC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; miRNA: microRNA. Tabla adaptada de *Mangas Int J Mol Sci. 2022* [317].

miRNA	AUC (IC del 95%)	% de sensibilidad	% de especificidad	Exactitud %	Valor p
Let-7c-5p	0.65 (0.5->0.7)	61.70	55.56	59.04	0.017
Let-7d-5p	0.62 (0.507-> 0.747)	52.63	58.70	55.95	0.046
Let-7f-5p	0.688 (0.5->0.8)	60.53	64.44	62.65	0.003
mi-R376a-3p	0.682 (0.5->0.8)	68.89	64.10	66.67	0.004
mi-R376c-3p	0.736 (0.6->0.8)	70.45	64.10	67.47	<0.001
Panel de 5	0.936 (0.8->0.9)	81.25	84.85	82.72	<0.001

Con la intención de aumentar su valor diagnóstico, desarrollamos un modelo multiparamétrico, que incluía tres miRNAs, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, junto con dos parámetros clínicos como los años de dislipidemia (DLP) y la

concentración de colesterol no-HDLc. Este score mostró una mayor precisión diagnóstica. El no-HDLc es considerado un indicador útil para evaluar el riesgo cardiovascular [321]. Este parámetro incluye todas las fracciones de colesterol aterogénicas, y se utiliza comúnmente en la evaluación del perfil lipídico para obtener información adicional sobre el riesgo cardiovascular más allá del colesterol total o del LDLc individualmente. En 2021 se publicó una actualización de los índices de cálculo de riesgo SCORE2 [12] y SCORE2-OP [322] reforzando la importancia del colesterol no-HDLc en la evaluación clínica.

Los niveles elevados de LDLc en la sangre están asociados con un mayor riesgo de ECV de causa aterosclerótica. El uso de medicamentos como las estatinas es crucial para reducirlos y disminuir el riesgo cardiovascular. El beneficio clínico de niveles más bajos de LDLc, ya sea genética o farmacológicamente, es determinante; cuanto más bajos y antes disminuyan, mejor será la evolución del paciente [323].

En resumen, nuestro estudio ha identificado un grupo de 5 miRNAs que discrimina a los individuos con IE frente a los que no la presentan. Hasta la fecha, no se había descrito ningún biomarcador de estas características. Proponemos un score multiparamétrico, que incluye tres miRNAs y dos parámetros clínicos, que apoyara al médico para la detección con mayor robustez de pacientes con IE. El uso de estos marcadores permitirá una estrategia terapéutica dirigida a evitar el abandono de una terapia vital para este perfil de pacientes, ofreciendo una alternativa real para tratar a pacientes con alto y muy alto riesgo cardiovascular.

Limitaciones

Una primera limitación es el reclutamiento prospectivo en clínica ambulatoria. El tamaño de la muestra no suficientemente grande para realizar un estudio estadístico robusto. Es necesaria revalidación experimental y estadística incrementando la cohorte. Finalmente, aunque las bases de datos registraron la expresión de los genes parentales, no tenemos confirmación sobre la secreción directa de estos miRNAs circulantes al espacio extracelular. Por lo tanto, la asociación de miRNAs con IE y todas las interacciones son putativas. Por lo tanto, se necesitan estudios confirmativos más amplios sobre los miRNAs circulantes para generar una firma de pronóstico mejor y reproducible para IE.

18.2 ARTÍCULO 2. LA SUPRESIÓN DE miR-16-5p PROTEGE A LOS CARDIOMIOCITOS HUMANOS CONTRA LA LESIÓN INDUCIDA POR EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha demostrado ampliamente que existe una correlación entre el desarrollo de enfermedades cardíacas y determinados procesos moleculares tales como el estrés en el RE celular y el estrés oxidativo [130][324]. Nuestro grupo demostró en trabajos previos la sobreexpresión de miR-16-5p en plasma de pacientes con ICM y miocardiopatía dilatada no isquémica (nICM) [263]. El miR-16-5p tiene un papel crítico en la progresión de la MCD a través de procesos biológicos interrelacionados como el estrés del RE, la inflamación, la autofagia y la apoptosis. El presente trabajo parte de la hipótesis que miR-16-5p puede contribuir al estrés oxidativo a través de la inducción del estrés de RE pudiendo su inhibición ejercer una función cardioprotectora en la lesión cardíaca mediada por estrés de RE.

Así, tras confirmar la sobreexpresión de miR-16-5 p en la población con ICM procedimos a valorar si existía un incremento del estrés oxidativo en el plasma de esta población frente a una población no isquémica, confirmándose a través del incremento de MDA y AOPPs, y el descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes, CAT, SOD, GPx y GSH. El MDA y los AOPP son dos marcadores de estrés oxidativo reconocidos en las enfermedades cardíacas isquémicas ambos se mostraron sobreexpresados en la cohorte ICM [325][326][327].

La sobreexpresión de miR-16-5p en el plasma de pacientes con ICM induce estrés del RE e incremento del ROS, contribuyendo al estrés oxidativo. Ello se confirma con el incremento de AOPP tras la sobreexpresión de miR-16-5p, si bien MDA no se alteró. En esta misma situación los genes *CAT*, *SOD*, *GPx* están infraexpresados y por tanto las proteínas CAT, GPX1 estaban marcadamente menos presentes en las células AC16.

La función mitocondrial en cardiomiocitos se ve alterada por el estrés del RE [328][329]. Esta disfunción mitocondrial, mediada por el estrés del RE, da lugar a un incremento de la producción de ROS en el corazón adulto [330][331]. Los resultados de nuestra investigación demostraron que la respiración mitocondrial, a través de la medida de la tasa de consumo de oxígeno por la mitocondria (OCR) en los cardiomioblastos humanos se ve disminuida al sobreexpresar miR16-5p. Así se ven

afectadas la síntesis de ATP acoplada a la respiración mitocondria, el proton H⁺, la respiración máxima respiratoria y la reserva respiratoria mitocondrial. Las células AC16 presentaron una alteración mitocondrial que tendría su origen en un estrés oxidativo causado por el estrés del RE. Este deterioro de la función mitocondrial esta mediada por la deficiencia de ATF6 [332] y, como nexo necesario entre el estrés del RE y estrés oxidativo en la isquemia miocárdica [324]. Jin y colaboradores demostraron que la eliminación de ATF6 en miocitos cardíacos sometidos a isquemia/reperfusión aumentaba los niveles de ROS y la muerte celular por necrosis; sin embargo, en la situación inversa, un incremento de ATF6, estos efectos se mitigaban. Esto coincide con hallazgos previos en los que se describe que la supresión de ATF6 en modelos animales aumentaba el daño en isquemia/reperfusión, mientras la sobreexpresión del gen mediada por AAV9 restablecía la función cardíaca [324]. Otro trabajo en esta línea demostraba que bajo activación farmacológica de ATF6 mejoraba la proteostasis del RE y disminuía el estrés oxidativo de los miocitos cardíacos in vitro [333].

Para demostrar el papel protector sobre el daño mediado por el estrés del RE cuando se produce la infraexpresión de miR-16-5p se trataron los cardiomiocitos AC16 con tunicamicina (TN). La TN aumenta el estrés del RE en los cardiomiocitos, aumentando la expresión de GRP78; además mientras los marcadores de IRE2 α y PERK están aumentados, la rama de ATF6 esta disminuida. ATF6 activa la expresión de los genes que codifican proteínas antioxidantes. Así, la inhibición de miR-16-5p con TN provoca que CAT y SOD1 se sobreexpresaban. De este modo, la TN disminuye la expresión de *ATG14* que regula la autofagia, y este efecto se rescata cuando se inhibe miR16-5p. La inhibición de miR-16-5p protege a los cardiomioblastos humanos de la apoptosis inducida por el estrés del RE, permitiendo la expresión de BCL-2 en células AC16 tratadas con TN y maximizó la regulación positiva de CHOP inducida por TN. Esto podría estar promovido por la regulación positiva de *ATF6* y *XBP1* tras la inhibición de miR-16-5p [334]. Está establecido que CHOP regula la apoptosis inducida por estrés del RE al disminuir la expresión de *BCL-2* [335]. Sin embargo, *BCL-2* es un objetivo directo de miR-16-5p [233], lo que indica que BCL-2 también puede regularse de manera independiente de CHOP, como ya se describió previamente [336]. Así, nuestro modelo experimental demuestra que el gen *ATF6* es una diana directa de miR-16-5p y que la inhibición de

este miRNA revierte la regulación negativa de *ATF6* inducida por tunicamicina (TN) en células cardíacas humanas. Por lo tanto, nuestras observaciones sugieren que miR-16-5p podría agravar el estrés oxidativo de una manera dependiente del estrés del RE, alterando la vía citoprotectora mediada por *ATF6* en los cardiomiocitos humanos.

Dado que se ha demostrado que *ATF6* se une al promotor de *XBP1*, mejorando su expresión [334], la regulación positiva de *XBP1* puede deberse a un efecto combinado de la activación de *ATF6* sobre la inhibición de miR-16-5p junto con la expresión de *XBP1* inducida por TN. Esta circunstancia es similar a la regulación positiva de *GPR78*, cuya expresión también está regulada por *ATF6*. De acuerdo con resultados anteriores que muestran que, aunque las tres vías de la UPR a menudo se activan juntas, puede ocurrir la activación selectiva de algunas vías junto con la supresión de otras [337][338].

El tratamiento con TN también indujo la expresión de miR-16-5p. Ello refuerza nuestra hipótesis de que miR-16-5p puede intervenir en la interacción entre el estrés del RE mediado por *ATF6* y la producción de ROS por el cardiomiocito. Con TN solo la expresión de *SOD1* se reguló negativamente. La discrepancia entre estos resultados y los observados con el tratamiento con miR-16-5p puede explicarse por el hecho de que la TN promueve la expresión de *XBP1*, mientras que miR-16-5p altera la expresión de *XBP1* [263]. Como *XBP1* es capaz de regular *CAT* a la baja [339], el efecto de miR-16-5p en la expresión de *CAT* podría compensarse mediante la regulación positiva de *XBP1*. La expresión de *SOD1* se rescató mediante la inhibición de miR-16-5p, mientras que se indujo la expresión de *CAT*, lo que respalda la idea de que miR-16-5p podría exacerbar el estrés oxidativo, regulando la expresión de genes antioxidantes a través de *ATF6*.

Limitaciones

Nuestra cohorte es pequeña aunque muy específica; todos los pacientes incluidos eran estrictamente sujetos de ICM. Se necesitarían estudios que incluyan un tamaño de muestra mayor para validar estos datos. La falta de muestras de tejido cardíaco, característica intrínseca común en los estudios clínicos en humanos, es un factor limitante importante para poder analizar los procesos *in situ*. Por ello se midieron

marcadores de estrés oxidativo en muestras de sangre, que son los más utilizados en la práctica clínica. La edad de la población de estudio mostró diferencias significativas entre cohortes, lo que podría haber afectado el estado de estrés oxidativo. Sin embargo, el análisis de correlación de Pearson no muestra correlación entre la edad y la expresión de miR-16-5p en pacientes con ICM ($r=-0,553$; $p=0,062$), lo que indica que la expresión de miR-16-5p no depende de la edad. Este estudio se basó en experimentos *in vitro* y no se ha probado el efecto de la supresión de miR-16-5p *in vivo* por lo que se debería replicar con animales para ver los resultados en organismos vivos.

18.3 ARTÍCULO 3. IMPLEMENTACION DE UN NUEVO ALGORITMO PARA LA REINTERPRETACIÓN DE VARIANTES AMBIGUAS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA GENÉTICA

El diagnóstico genético permite identificar la alteración genética que causa la patología, como es el caso de la MCD. Además, identificar la causa implica poder realizar segregación familiar y saber quién es portador del defecto genético por lo que implica estar a riesgo de padecer la misma enfermedad. Por lo tanto, estas variantes genéticas se utilizan como otra clase de marcadores genéticos que se usan para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del riesgo de MCs. En este caso la identificación de variantes patógenas o probablemente patógenas (P/LP) e incluso variantes de significado incierto (VUS), en pacientes afectados y en sus familiares a riesgo de sufrir la misma patología es una herramienta de recomendación internacional [72], pese a que solo las P y LP tienen una aplicación clínica.

Para determinar la asociación de una variante a una enfermedad hay que seguir guías internacionales que obligan a valorar la información clínica del paciente, la frecuencia de los alelos en la población general, las proyecciones *in silico* de los efectos moleculares, existencia de estudios funcionales, entre otros factores [178]. Categorizar variantes como P/LP ayuda a los clínicos a confirmar diagnósticos, proporcionar pronósticos, refinar las estrategias de tratamiento y abordar los riesgos para los miembros de la familia.

Muchas variantes se clasifican como VUS porque en el momento de su evaluación, las evidencias disponibles no permiten establecer su causalidad en relación con la patología. Las VUS pueden reevaluarse cuando surge evidencia adicional, lo que a veces lleva a su reclasificación como P/LP o benigna o probablemente benigna (B/LB) [186] aunque frecuentemente muchas de ellas se mantengan en la categoría de VUS.

En las MCs la revaloración de variantes se recomienda en un periodo inferior a 5 años [182][183][184][340]. En el estudio realizado en MCD, hemos identificado que el 12% de las variantes VUS modificaron su asignación inicial permitiendo esclarecer su relación con la patología. Hasta donde conocemos es el primer estudio de estas características centrado exclusivamente en MCD. El 8% de las VUS aumentaron el potencial patogénico a variante de significado incierto con potencial perjudicial (VLP)

debido a la reducción de la frecuencia del alelo de menor frecuencia (MAF) y para algunas variantes, la disponibilidad de nuevas evidencias como estudios funcionales adicionales desde la primera clasificación.

Stroeks y colaboradores sugieren que una variante VUS en un gen fuertemente asociado a una patología (como lo son en nuestro estudio) está asociada con un pronóstico adverso de la enfermedad [341]. En base a ello, nosotros sugerimos un algoritmo de subclasificación de las variantes VUS de manera que aquellas con mayor cantidad de evidencias hacia su posible función patogénica queden como VUS-LP mientras aquellas con mayor peso de benignidad pasen a la categoría de VUS-LB. Estas nuevas categorías no afectan a la práctica del profesional clínico para la adopción de medidas terapéuticas [72][142] o seguimiento del paciente.

El reanálisis de variantes debe establecerse como una práctica común en todos aquellos servicios dónde sea posible. Aunque el porcentaje que va a cambiar de categoría variará en función de la patología con la que se trabaje, las variantes missense son habitualmente las más abundantes y serán las que tengan un mayor número de re-clasificaciones. En nuestro estudio, las variantes missense VUS son las más frecuentemente reportadas. Por ello también son las que mayoritariamente cambian su clasificación si son re-evaluadas al cabo del tiempo. Esta evidencia coincide con la descrita por otros estudios reportados [186][342].

Con la armonización de criterios de clasificación a partir de las guías internacionales aparecidas desde 2015 [178] la cantidad de variantes descritas como causales o posiblemente causales de una patología ha ido reduciéndose. Esto casa con los resultados presentados ya que el porcentaje de variantes reclasificadas fue disminuyendo entre 2016 y 2019. Según Chen et al. el tiempo medio entre la clasificación original y la reclasificación es de 30,7 meses para pasar a LB/B y se necesitan 22,4 meses para LP/P [186]. La frecuencia poblacional contribuye a reclasificar en LB/B a lo largo del tiempo. Al centrarnos en la actualización de las frecuencias poblacionales, el algoritmo propuesto ofrece la capacidad de denotar que las variantes VUS con inclinación hacia ser perjudiciales tienden a clasificarse cada vez más en la actualidad. Al mismo tiempo, se pueden descartar un mayor número de variantes VUS que no sugieren un trasfondo genético causal. En MCD, hemos observado este patrón, evidenciado por una disminución anual en el número

de VUS a medida que nos aproximamos al presente. Es importante mencionar que la obtención de clasificaciones precisas se debe principalmente a las actualizaciones en las frecuencias poblacionales, sin incluir estudios funcionales o correlaciones genotipo-fenotipo de grandes familias durante más de 3 generaciones. A pesar de estas limitaciones, como se mencionó anteriormente, la inclusión de estos estudios adicionales es necesaria para poder concluir un papel patogénico definitivo en estas variantes raras en MCD [72][343].

Aunque las variantes truncadas en el gen *TTN* explican el mayor porcentaje de casos de MCD con origen genético, la función de las variantes missense como origen de la enfermedad aún no está claro [155]. En nuestro estudio la mayor parte de variantes VUS permanecen en esta categoría o cambian a LB o B siendo mayoritariamente missense [180][344]. Este gen, junto con *LMNA*, ha sido descrito como el más fuertemente vinculado a MCD [72][142], aunque esta relación se explica por la identificación de variantes radicales (*nonsense*, *indels*...) [345]. En nuestro caso prácticamente todas las variantes *nonsense* e *indel* aumentaron su papel potencial perjudicial a VUS-LP.

Limitaciones

Todos los casos incluidos en nuestra cohorte pueden ser portadores de otras variantes raras en genes no incluidos en el panel utilizado para el análisis genético. La falta de datos funcionales disponibles para la mayoría de las variantes raras, así como la falta de segregación familiar impide una interpretación más precisa. Para respaldar nuestros resultados, las reclasificaciones/reinterpretaciones de todas las variantes deberían corroborarse en cohortes adicionales más grandes de pacientes con MCD de origen genético.

19 CONCLUSIONES

1. Se han identificado cinco miRNAs, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, sobreexpresados en el grupo de intolerantes a estatinas respecto a pacientes no intolerantes a estatinas.
2. La combinación de los miRNAs sobreexpresados, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-376a-3p y miR-376c-3p, aumenta significativamente la capacidad diagnóstica y su valor como biomarcador.
3. Un *score* que incluya, tres miRNAs con variables clínicas dislipémicas y los niveles de colesterol no HDLc, mejora aún más la capacidad diagnóstica.
4. miR-16-5p induce estrés oxidativo en células AC16 y promueve la disfunción mitocondrial contribuyendo a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno.
5. La inhibición de miR-16-5p ejerce un efecto cardioprotector aumentando la expresión de genes antioxidantes, revirtiendo la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplasmático y, así, rescatando la expresión de genes antiapoptóticos y de autofagia.
6. ATF6 es el gen diana directo de miR-16-5p, y mecanismo por el cual regula el estrés del retículo endoplasmático.
7. Una reclasificación/reinterpretación periódica de variantes de significado incierto como mínimo una vez cada cinco años tiene consecuencias prácticas para los pacientes y sus familiares.
8. Las variantes de significado incierto reevaluadas cambian su clasificación principalmente debido a una actualización de las frecuencias poblacionales.
9. Proponemos un nuevo algoritmo específico que ayuda en la interpretación de variantes de significado incierto en la miocardiopatía dilatada de origen genético que podría mejorar la gestión clínica de los pacientes y sus familias.

20 BIBLIOGRAFÍA

1. https://www.who.int/es/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
marzo 2024
2. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-325. doi:10.1038/nature10146
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41. doi: 10.1038/35025203. PMID: 11001066; PMCID: PMC2826222..
4. Libby, P., Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 8, 1257–1262 (2002). doi.org/10.1038/nm1102-1257
5. Jin J. Risk Assessment for Cardiovascular Disease With Nontraditional Risk Factors. *JAMA*. 2018;320(3):316. doi:10.1001/jama.2018.9122
6. Global Cardiovascular Risk Consortium, Magnussen C, Ojeda FM, et al. Global Effect of Modifiable Risk Factors on Cardiovascular Disease and Mortality. *N Engl J Med*. 2023;389(14):1273-1285. doi:10.1056/NEJMoa2206916.
7. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines published correction appears in *Circulation*. 2019 Sep 10;140(11):e647-e648 published correction appears in *Circulation*. 2020 Jan 28;141(4):e59 published correction appears in *Circulation*. 2020 Apr 21;141(16):e773. *Circulation*. 2019;140(11):e563-e595. doi:10.1161/CIR.0000000000000677.
8. Hamirani YS, Pandey S, Rivera JJ, et al. Markers of inflammation and coronary artery calcification: a systematic review. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):1-7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.045
9. Organización Mundial de la Salud. Atlas mundial sobre prevención y control de enfermedades cardiovasculares ; Mendis, S., Puska, P., Norrving, B., Eds.; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, Suiza, 2011.

10. Yusuf, S.; Hawken, S.; Ôunpuu, S.; Dans, T.; Avezum, A.; Lanas, F.; McQueen, M.; Budaj, A.; Pais, P.; Varigos, J.; et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the Interheart Study): Case-control study. *Lancet* 2004, 364, 937–952.
11. Walli-Attaei, M.; Joseph, P.; Rosengren, A.; Chow, C.K.; Rangarajan, S.; Lear, S.A.; AlHabib, K.F.; Davletov, K.; Dans, A.; Lanas, F.; et al. Variations between women and men in risk factors, treatments, cardiovascular disease incidence, and death in 27 high-income, middle-income, and low-income countries (pure): A prospective cohort study. *Lancet* 2020, 396, 97–109.
12. SCORE2 working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2 risk prediction algorithms: new models to estimate 10-year risk of cardiovascular disease in Europe. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2439-2454. doi:10.1093/eurheartj/ehab309.
13. Yadlowsky S, Hayward RA, Sussman JB, McClelland RL, Min YI, Basu S. Clinical Implications of Revised Pooled Cohort Equations for Estimating Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *Ann Intern Med.* 2018;169(1):20-29. doi:10.7326/M17-3011.
14. Jaspers NEM, Blaha MJ, Matsushita K, et al. Prediction of individualized lifetime benefit from cholesterol lowering, blood pressure lowering, antithrombotic therapy, and smoking cessation in apparently healthy people published correction appears in *Eur Heart J.* 2020 Dec 21;41(48):4579. *Eur Heart J.* 2020;41(11):1190-1199. doi:10.1093/eurheartj/ehz239.
15. Forouhi NG, Sattar N. CVD risk factors and ethnicity--a homogeneous relationship?. *Atheroscler Suppl.* 2006;7(1):11-19. doi:10.1016/j.atherosclerosisissup.2006.01.003
16. Fuchs FD, Whelton PK. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension.* 2020;75(2):285-292. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240
17. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015;372(16):1489-1499. doi:10.1056/NEJMoa1501031
18. Brunner FJ, Waldeyer C, Ojeda F, et al. Application of non-HDL cholesterol for population-based cardiovascular risk stratification: results from the Multinational Cardiovascular Risk Consortium [published correction appears in

Lancet. 2019 Dec 6;] [published correction appears in Lancet. 2020 Jan 4;395(10217):32]. Lancet. 2019;394(10215):2173-2183. doi:10.1016/S0140-6736(19)32519-X

19. Gencer B, Marston NA, Im K, et al. Efficacy and safety of lowering LDL cholesterol in older patients: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Lancet. 2020;396(10263):1637-1643. doi:10.1016/S0140-6736(20)32332-1
20. Johannesen CDL, Langsted A, Mortensen MB, Nordestgaard BG. Association between low density lipoprotein and all cause and cause specific mortality in Denmark: prospective cohort study [published correction appears in BMJ. 2021 Feb 12;372:n422]. BMJ. 2020;371:m4266. Published 2020 Dec 8. doi:10.1136/bmj.m4266.
21. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. N Engl J Med. 2007;357(13):1301-1310. doi:10.1056/NEJMoa064278
22. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. N Engl J Med. 2015;372(16):1489-1499. doi:10.1056/NEJMoa1501031
23. Yusuf S, Joseph P, Rangarajan S, et al. Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study [published correction appears in Lancet. 2020 Mar 7;395(10226):784]. Lancet. 2020;395(10226):795-808. doi:10.1016/S0140-6736(19)32008-2
24. Wood AM, Kaptoge S, Butterworth AS, et al. Risk thresholds for alcohol consumption: combined analysis of individual-participant data for 599 912 current drinkers in 83 prospective studies [published correction appears in Lancet. 2018 Jun 2;391(10136):2212]. Lancet. 2018;391(10129):1513-1523. doi:10.1016/S0140-6736(18)30134-X.
25. Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015 [published correction appears in Lancet. 2017 Jun 17;389(10087):e15] [published correction appears in Lancet. 2018 Apr 21;391(10130):1576]. Lancet. 2017;389(10082):1907-1918. doi:10.1016/S0140-6736(17)30505-6

26. Daiber A, Lelieveld J, Steven S, et al. The "exposome" concept - how environmental risk factors influence cardiovascular health. *Acta Biochim Pol.* 2019;66(3):269-283. doi:10.18388/abp.2019_2853
27. Münzel T, Hahad O, Sørensen M, et al. Environmental risk factors and cardiovascular diseases: a comprehensive expert review. *Cardiovasc Res.* 2022;118(14):2880-2902. doi:10.1093/cvr/cvab316
28. Manfrini O, Bugiardini R. Behavioural risk factors and cardiovascular disease: are women at higher risk?. *Lancet.* 2022;400(10355):788-789. doi:10.1016/S0140-6736(22)01736-6.
29. Wang TJ. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. *Circulation.* 2011 Feb 8;123(5):551-65. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.912568. PMID: 21300963; PMCID: PMC3059807.
30. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins [published correction appears in *Lancet.* 2005 Oct 15-21;366(9494):1358] [published correction appears in *Lancet.* 2008 Jun 21;371(9630):2084]. *Lancet.* 2005;366(9493):1267-1278. doi:10.1016/S0140-6736(05)67394-1
31. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Gao P, et al. Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *JAMA.* 2012;307(23):2499-2506. doi:10.1001/jama.2012.6571
32. Ference, B.A., Mahajan, N. The Role of Early LDL Lowering to Prevent the Onset of Atherosclerotic Disease. *Curr Atheroscler Rep* 15, 312 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11883-013-0312-1>
33. Willer CJ, Schmidt EM, Sengupta S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. *Nat Genet.* 2013;45(11):1274-1283. doi:10.1038/ng.2797
34. Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM, et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. *Eur Heart J.* 2015;36(9):539-550. doi:10.1093/eurheartj/ehv571
35. Silverman MG, Ference BA, Im K, et al. Association Between Lowering LDL-C and Cardiovascular Risk Reduction Among Different Therapeutic

- Interventions: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2016;316(12):1289-1297. doi:10.1001/jama.2016.13985
36. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9753):1670-1681. doi:10.1016/S0140-6736(10)61350-5
 37. Bruikman CS, Hovingh GK, Kastelein JJP. Molecular basis of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Cardiol*. 2017;32(3):262-266. doi:10.1097/HCO.0000000000000385
 38. Varghese MJ. Familial hypercholesterolemia: A review. *Ann Pediatr Cardiol*. 2014;7(2):107-117. doi:10.4103/0974-2069.132478
 39. Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk [published correction appears in *Eur Heart J*. 2020 Nov 21;41(44):4255]. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-188. doi:10.1093/eurheartj/ehz455
 40. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines [published correction appears in *J Am Coll Cardiol*. 2019 Jun 25;73(24):3237-3241]. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(24):e285-e350. doi:10.1016/j.jacc.2018.11.003
 41. Nozue T. Lipid Lowering Therapy and Circulating PCSK9 Concentration. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(9):895-907. doi:10.5551/jat.RV17012
 42. Maxwell KN, Breslow JL. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(18):7100-7105. doi:10.1073/pnas.0402133101
 43. Ward NC, Kostner KM, Sullivan DR, Nestel P, Watts GF. Molecular, Population, and Clinical Aspects of Lipoprotein(a): A Bridge Too Far?. *J Clin Med*. 2019;8(12):2073. Published 2019 Nov 27. doi:10.3390/jcm8122073
 44. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, et al. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-1722. doi:10.1056/NEJMoa1615664

45. Fitchett DH, Hegele RA, Verma S. Cardiology patient page. Statin intolerance. *Circulation*. 2015;131(13):e389-e391. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013189
46. Guyton JR, Bays HE, Grundy SM, Jacobson TA, The National Lipid Association Statin Intolerance Panel. An assessment by the Statin Intolerance Panel: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014;8(3 Suppl):S72-S81. doi:10.1016/j.jacl.2014.03.002
47. Mancini GB, Baker S, Bergeron J, et al. Diagnosis, Prevention, and Management of Statin Adverse Effects and Intolerance: Canadian Consensus Working Group Update (2016). *Can J Cardiol*. 2016;32(7 Suppl):S35-S65. doi:10.1016/j.cjca.2016.01.003
48. Fernandez G, Spatz ES, Jablecki C, Phillips PS. Statin myopathy: a common dilemma not reflected in clinical trials. *Cleve Clin J Med*. 2011;78(6):393-403. doi:10.3949/ccjm.78a.10073
49. Rojas-Fernandez CH, Goldstein LB, Levey AI, Taylor BA, Bittner V, The National Lipid Association's Safety Task Force. An assessment by the Statin Cognitive Safety Task Force: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014;8(3 Suppl):S5-S16. doi:10.1016/j.jacl.2014.02.013
50. Guber K, Pemmasani G, Malik A, Aronow WS, Yandrapalli S, Frishman WH. Statins and Higher Diabetes Mellitus Risk: Incidence, Proposed Mechanisms, and Clinical Implications. *Cardiol Rev*. 2021;29(6):314-322. doi:10.1097/CRD.0000000000000348
51. Carter AA, Gomes T, Camacho X, Juurlink DN, Shah BR, Mamdani MM. Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study [published correction appears in *BMJ*. 2013;347:f4356]. *BMJ*. 2013;346:f2610. Published 2013 May 23. doi:10.1136/bmj.f2610
52. Rius Tarruella J, Millán Núñez-Cortés J, Pedro-Botet J, Pintó Sala X. La diabetogenicidad de las estatinas: ¿son todas iguales? Estado de la cuestión [Statin diabetogenicity: are all the same? state of art]. *Clin Investig Arterioscler*. 2015;27(3):148-158. doi:10.1016/j.arteri.2015.02.001
53. Serban MC, Colantonio LD, Manthripragada AD, et al. Statin Intolerance and Risk of Coronary Heart Events and All-Cause Mortality Following Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(11):1386-1395. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.036

54. Banach M, Rizzo M, Toth PP, et al. Statin intolerance - an attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Arch Med Sci.* 2015;11(1):1-23. doi:10.5114/aoms.2015.49807
55. Rosenson RS, Baker S, Banach M, et al. Optimizing Cholesterol Treatment in Patients With Muscle Complaints. *J Am Coll Cardiol.* 2017;70(10):1290-1301. doi:10.1016/j.jacc.2017.07.752
56. Toth PP, Patti AM, Giglio RV, et al. Management of Statin Intolerance in 2018: Still More Questions Than Answers. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2018;18(3):157-173. doi:10.1007/s40256-017-0259-7
57. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, et al. Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J.* 2015;36(17):1012-1022. doi:10.1093/eurheartj/ehv043
58. Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, Kopecky SL, Parker BA, The National Lipid Association's Muscle Safety Expert Panel. An assessment by the Statin Muscle Safety Task Force: 2014 update. *J Clin Lipidol.* 2014;8(3 Suppl):S58-S71. doi:10.1016/j.jacl.2014.03.004
59. Maningat P, Breslow JL. Needed: pragmatic clinical trials for statin-intolerant patients. *N Engl J Med.* 2011;365(24):2250-2251. doi:10.1056/NEJMp1112023
60. Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005;19(6):403-414. doi:10.1007/s10557-005-5686-z
61. Rosenbaum D, Dallongeville J, Sabouret P, Bruckert E. Discontinuation of statin therapy due to muscular side effects: a survey in real life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(9):871-875. doi:10.1016/j.numecd.2012.04.012
62. Riaz H, Khan AR, Khan MS, et al. Meta-analysis of Placebo-Controlled Randomized Controlled Trials on the Prevalence of Statin Intolerance. *Am J Cardiol.* 2017;120(5):774-781. doi:10.1016/j.amjcard.2017.05.046
63. Taylor BA, Lorson L, White CM, Thompson PD. A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with confirmed statin myopathy. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):329-335. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.016

64. Parker BA, Capizzi JA, Grimaldi AS, et al. Effect of statins on skeletal muscle function. *Circulation*. 2013;127(1):96-103. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.136101
65. Parker BA, Gregory SM, Lorson L, Polk D, White CM, Thompson PD. A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with statin myopathy: rationale and study design. *J Clin Lipidol*. 2013;7(3):187-193. doi:10.1016/j.jacl.2013.02.002
66. Pedro-Botet J, Millán Núñez-Cortés J, Chillarón JJ, Flores-Le Roux JA, Rius J. Severity of statin-induced adverse effects on muscle and associated conditions: data from the DAMA study. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(12):1583-1587. doi:10.1080/14740338.2016.1238068
67. Di Stasi SL, MacLeod TD, Winters JD, Binder-Macleod SA. Effects of statins on skeletal muscle: a perspective for physical therapists. *Phys Ther*. 2010;90(10):1530-1542. doi:10.2522/ptj.20090251
68. Schirris TJ, Renkema GH, Ritschel T, et al. Statin-Induced Myopathy Is Associated with Mitochondrial Complex III Inhibition. *Cell Metab*. 2015;22(3):399-407. doi:10.1016/j.cmet.2015.08.002
69. Phillips PS, Haas RH, Bannykh S, et al. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Ann Intern Med*. 2002;137(7):581-585. doi:10.7326/0003-4819-137-7-200210010-00009
70. Maisch B, Noutsias M, Ruppert V, Richter A, Pankuweit S. Cardiomyopathies: classification, diagnosis, and treatment. *Heart Fail Clin*. 2012;8(1):53-78. doi:10.1016/j.hfc.2011.08.014
71. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2023;44(37):3503-3626. doi:10.1093/eurheartj/ehad194
72. Lukas Laws J, Lancaster MC, Ben Shoemaker M, et al. Arrhythmias as Presentation of Genetic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2022;130(11):1698-1722. doi:10.1161/CIRCRESAHA.122.319835
73. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2016;37(23):1850-1858. doi:10.1093/eurheartj/ehv727

74. Richardson WS, Wilson MC, Nishikawa J, Hayward RS. The well-built clinical question: a key to evidence-based decisions. *ACP J Club*. 1995;123(3):A12-A13.
75. Arola A, Jokinen E, Ruuskanen O, et al. Epidemiology of idiopathic cardiomyopathies in children and adolescents. A nationwide study in Finland. *Am J Epidemiol*. 1997;146(5):385-393. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009291
76. Reichart, D.; Magnussen, C.; Zeller, T.; Blankenberg, S. Dilated cardiomyopathy: From epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J. Intern. Med*. 2019, 286, 362–372.
77. Weintraub, R.G.; Semsarian, C.; Macdonald, P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2017, 390, 400–414.
78. Tayal U, Prasad SK. Myocardial remodelling and recovery in dilated cardiomyopathy. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2017;6:2048004017734476. Published 2017 Oct 9. doi:10.1177/2048004017734476
79. Yancy CW, Jessup M, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128(16):e240-e327. doi:10.1161/CIR.0b013e31829e8776
80. Merlo M, Masè M, Cannatà A, et al. Management of nonischemic-dilated cardiomyopathies in clinical practice: a position paper of the working group on myocardial and pericardial diseases of Italian Society of Cardiology. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2020;21(12):927-943. doi:10.2459/JCM.0000000000001050
81. Lapu-Bula R, Robert A, De Kock M, et al. Risk stratification in patients with dilated cardiomyopathy: contribution of Doppler-derived left ventricular filling. *Am J Cardiol*. 1998;82(6):779-785. doi:10.1016/s0002-9149(98)00460-3
82. Pocock SJ, Ariti CA, McMurray JJ, et al. Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies. *Eur Heart J*. 2013;34(19):1404-1413. doi:10.1093/eurheartj/ehs337
83. Aleksova A, Carriere C, Zecchin M, et al. New-onset left bundle branch block independently predicts long-term mortality in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: data from the Trieste Heart Muscle Disease Registry. *Europace*. 2014;16(10):1450-1459. doi:10.1093/europace/euu016

84. Merlo M, Pyxaras SA, Pinamonti B, Barbati G, Di Lenarda A, Sinagra G. Prevalence and prognostic significance of left ventricular reverse remodeling in dilated cardiomyopathy receiving tailored medical treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(13):1468-1476. doi:10.1016/j.jacc.2010.11.030
85. Rusnak J, Behnes M, Weiß C, et al. Non-ischemic compared to ischemic cardiomyopathy is associated with increasing recurrent ventricular tachyarrhythmias and ICD-related therapies. *J Electrocardiol*. 2020;59:174-180. doi:10.1016/j.jelectrocard.2020.02.009
86. Merlo M, Gentile P, Artico J, et al. Arrhythmic risk stratification in patients with dilated cardiomyopathy and intermediate left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2019;20(5):343-350. doi:10.2459/JCM.0000000000000792
87. Crescenzi C, Silvetti E, Romeo F, Martino A, Bressi E, Panattoni G, Stefanini M, Stazi A, Danza ML, Rebecchi M, Canestrelli S, Fedele E, Lanza O, Lanzillo C, Fusco A, Golia P, De Ruvo E, Calò L. The electrocardiogram in non-ischaemic-dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J Suppl*. 2023 Apr 26;25(Suppl C):C179-C184. doi: 10.1093/eurheartjsupp/suad043. PMID: 37125290; PMCID: PMC10132560.
88. Merlo M, Gagno G, Baritussio A, et al. Clinical application of CMR in cardiomyopathies: evolving concepts and techniques : A position paper of myocardial and pericardial diseases and cardiac magnetic resonance working groups of Italian society of cardiology. *Heart Fail Rev*. 2023;28(1):77-95. doi:10.1007/s10741-022-10235-9
89. Goebel J, Seifert I, Nensa F, Schemuth HP, Maderwald S, Quick HH, et al. Can native T1 mapping differentiate between healthy and diffuse diseased myocardium in clinical routine cardiac MR imaging? *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155591>.
90. Di Cesare E, Cademartiri F, Carbone I, et al. Clinical indications for the use of cardiac MRI. By the SIRM Study Group on Cardiac Imaging. *La Radiologia Medica*. 2013 Aug;118(5):752-798. DOI: 10.1007/s11547-012-0899-2. PMID: 23184241.
91. Porcari A, Baggio C, Fabris E, et al. Endomyocardial biopsy in the clinical context: current indications and challenging scenarios. *Heart Fail Rev*. 2023;28(1):123-135. doi:10.1007/s10741-022-10247-5

92. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82(11):1111-1129. doi:10.1161/01.res.82.11.1111
93. Zhang C, Syed TW, Liu R, Yu J. Role of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:29. Published 2017 May 12. doi:10.3389/fcvm.2017.00029
94. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(4):a036319. Published 2020 Apr 1. doi:10.1101/cshperspect.a036319
95. Hu Q, Wu D, Chen W, et al. Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(46):16254-16261. doi:10.1073/pnas.1418000111
96. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355-365. doi:10.1016/s0092-8674(00)81874-7
97. Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(3):143-159. doi:10.1007/BF02592977
98. Sessler T, Healy S, Samali A, Szegezdi E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol Ther.* 2013;140(2):186-199. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.009
99. Schleich K, Lavrik IN. Mathematical modeling of apoptosis. *Cell Commun Signal.* 2013;11(1):44. Published 2013 Jun 26. doi:10.1186/1478-811X-11-44
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82(11):1111-1129. doi:10.1161/01.res.82.11.1111.
100. Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 2;17(3):327. doi: 10.3390/ijms17030327. PMID: 26950115; PMCID: PMC4813189.
101. So JS. Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Mol Cells.* 2018 Aug 31;41(8):705-716. doi: 10.14348/molcells.2018.0241. Epub 2018 Jul 30. Erratum in: *Mol Cells.* 2019 Jun 30;42(6):501. PMID: 30078231; PMCID: PMC6125421

102. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):519-529. doi:10.1038/nrm2199
103. Chien V, Aitken JF, Zhang S, et al. The chaperone proteins HSP70, HSP40/DnaJ and GRP78/BiP suppress misfolding and formation of β -sheet-containing aggregates by human amylin: a potential role for defective chaperone biology in Type 2 diabetes. *Biochem J.* 2010;432(1):113-121. doi:10.1042/BJ20100434
104. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 2019;226:156-163. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.022
105. Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2011;334(6059):1086-1090. doi:10.1126/science.1209235
106. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 2000;6(5):1099-1108. doi:10.1016/s1097-2765(00)00108-8
107. Lin JH, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science.* 2007;318(5852):944-949. doi:10.1126/science.1146361
108. Han J, Back SH, Hur J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol.* 2013;15(5):481-490. doi:10.1038/ncb2738.
109. Lee KP, Dey M, Neculai D, Cao C, Dever TE, Sicheri F. Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell.* 2008;132(1):89-100. doi:10.1016/j.cell.2007.10.057
110. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* 2011;334(6059):1081-1086. doi:10.1126/science.1209038
111. Ren J, Bi Y, Sowers JR, Hetz C, Zhang Y. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(7):499-521. doi:10.1038/s41569-021-00511-w.
112. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):352. Published 2023 Sep 15. doi:10.1038/s41392-023-01570-w

113. Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*. 2015;11(11):1956-1977. doi:10.1080/15548627.2015.1091141
114. Gatica D, Chiong M, Lavandero S, Klionsky DJ. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system published correction appears in *Circ Res*. 2015 Mar 27;116(7):e56. *Circ Res*. 2015;116(3):456-467. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.303788
115. Salabei JK, Conklin DJ. Cardiovascular autophagy: crossroads of pathology, pharmacology and toxicology. *Cardiovasc Toxicol*. 2013;13(3):220-229. doi:10.1007/s12012-013-9200-8.
116. Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2017;120(11):1812-1824. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311082
117. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1576-1582. doi:10.1038/sj.cdd.4402200
118. Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Jun;95:19-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.032. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26546165; PMCID: PMC4861696.
119. Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 2013 Jul 25;8(21):2003-14. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009. PMID: 25206509; PMCID: PMC4145906.
120. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):333-343. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004 .
121. Tretter L, Adam-Vizi V. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005;360(1464):2335-2345. doi:10.1098/rstb.2005.1764.
122. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881-891. doi:10.1016/s0092-8674(01)00611-0

123. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;107(7):839-850. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.224766
124. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, et al. ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;349(4):1406-1411. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.009.
125. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012 Dec;26(6):711-23. doi: 10.1016/j.beem.2012.05.003. Epub 2012 Jun 23. PMID: 23168274; PMCID: PMC3513836.
126. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(6):1065-1089. doi:10.1006/jmcc.2001.1378.
127. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;14(1):434-456. Published 2012 Dec 24. doi:10.3390/ijms14010434
128. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):222-230. doi:10.1016/s0891-5849(00)00317-8.
129. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(12):2277-2293. doi:10.1089/ars.2007.1782
130. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2012;33(20):2551-2567. doi:10.1093/eurheartj/ehs184
131. Januzzi JL Jr, Rehman SU, Mohammed AA, et al. Use of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide to guide outpatient therapy of patients with chronic left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(18):1881-1889. doi:10.1016/j.jacc.2011.03.072
132. de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Fernández-Sanjurjo M, et al. Circulating microRNAs as emerging cardiac biomarkers responsive to acute exercise. *Int J Cardiol.* 2018;264:130-136. doi:10.1016/j.ijcard.2018.02.092
133. Lesizza P, Aleksova A, Ortis B, Beltrami AP, Giacca M, Sinagra G. Regenerative Medicine and Biomarkers for Dilated Cardiomyopathy. In: Sinagra

- G, Merlo M, Pinamonti B, eds. Dilated Cardiomyopathy: From Genetics to Clinical Management. Cham (CH): Springer; May 18, 2019.173-185.
134. Dhingra R, Vasan RS. Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. Trends Cardiovasc Med. 2017 Feb;27(2):123-133. doi: 10.1016/j.tcm.2016.07.005. Epub 2016 Jul 28. PMID: 27576060; PMCID: PMC5253084.
 135. Olson TM, et al. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science. 1998;280:750–752. doi: 10.1126/science. 280.5364.750
 136. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. N Engl J Med. 1999;341(23):1715-1724. doi:10.1056/NEJM199912023412302
 137. Jordan E, Peterson L, Ai T, et al. Evidence-Based Assessment of Genes in Dilated Cardiomyopathy. Circulation. 2021;144(1):7-19. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.053033
 138. Akinrinade, O., Lesurf, R., Genomics England Research Consortium. et al. Age and Sex Differences in the Genetics of Cardiomyopathy. J. of Cardiovasc. Trans. Res. 16, 1287–1302 (2023). <https://doi.org/10.1007/s12265-023-10411-8>
 139. McNally EM, Golbus JR, Puckelwartz MJ. Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. J Clin Invest. 2013;123(1):19-26. doi:10.1172/JCI62862
 140. McNally EM, Mestroni L. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. Circ Res. 2017;121(7):731-748. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309396
 141. Wilde AAM, Semsarian C, Márquez MF, et al. European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases published correction appears in Europace. 2022 Aug 30;Europace. 2022;24(8):1307-1367. doi:10.1093/europace/euac030
 142. Frank D, Yusuf Rangrez A, Friedrich C, et al. Cardiac α -Actin (ACTC1) Gene Mutation Causes Atrial-Septal Defects Associated With Late-Onset Dilated Cardiomyopathy. Circ Genom Precis Med. 2019;12(8):e002491. doi:10.1161/CIRCGEN.119.002491

143. Cho KW, Lee J, Kim Y. Genetic Variations Leading to Familial Dilated Cardiomyopathy. *Mol Cells*. 2016;39(10):722-727. doi:10.14348/molcells.2016.0061
144. de Frutos F, Ochoa JP, Navarro-Peñalver M, et al. Natural History of MYH7-Related Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2022;80(15):1447-1461. doi:10.1016/j.jacc.2022.07.023
145. Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J*. 1995;9(9):755-767. doi:10.1096/fasebj.9.9.7601340
146. Li MX, Hwang PM. Structure and function of cardiac troponin C (TNNC1): Implications for heart failure, cardiomyopathies, and troponin modulating drugs. *Gene*. 2015;571(2):153-166. doi:10.1016/j.gene.2015.07.074
147. Ho YL, Lin YH, Tsai WY, Hsieh FJ, Tsai HJ. Conditional antisense-knockdown of zebrafish cardiac troponin C as a new animal model for dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 2009;73(9):1691-1697. doi:10.1253/circj.cj-09-0210
148. Hershberger RE, Pinto JR, Parks SB, et al. Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(4):306-313. doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.846733
149. Lakdawala NK, Dellefave L, Redwood CS, et al. Familial dilated cardiomyopathy caused by an alpha-tropomyosin mutation: the distinctive natural history of sarcomeric dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(4):320-329. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.017
150. Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, et al. Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Med Genet*. 2011;54(6):e570-e575. doi:10.1016/j.ejmg.2011.07.005
151. Roberts AM, Ware JS, Herman DS, et al. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*. 2015;7(270):270ra6. doi:10.1126/scitranslmed.3010134
152. Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012;366(7):619-628. doi:10.1056/NEJMoa1110186
153. Tabish AM, Azzimato V, Alexiadis A, Buyandelger B, Knöll R. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated

- cardiomyopathy. *Biophys Rev.* 2017;9(3):207-223. doi:10.1007/s12551-017-0265-7
154. Akinrinade O, Heliö T, Lekanne Deprez RH, et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy published correction appears in *Sci Rep.* 2020 Oct 9;10(1):17264. *Sci Rep.* 2019;9(1):4093. Published 2019 Mar 11. doi:10.1038/s41598-019-39911-x
 155. Captur G, Arbustini E, Bonne G, et al. Lamin and the heart. *Heart.* 2018;104(6):468-479. doi:10.1136/heartjnl-2017-312338
 156. Pérez-Serra A, Toro R, Campuzano O, et al. A novel mutation in lamin a/c causing familial dilated cardiomyopathy associated with sudden cardiac death. *J Card Fail.* 2015;21(3):217-225. doi:10.1016/j.cardfail.2014.12.003
 157. Markandeya YS, Tsubouchi T, Hacker TA, Wolff MR, Belardinelli L, Balijepalli RC. Inhibition of late sodium current attenuates ionic arrhythmia mechanism in ventricular myocytes expressing LaminA-N195K mutation. *Heart Rhythm.* 2016;13(11):2228-2236. doi:10.1016/j.hrthm.2016.08.007
 158. van Rijsingen IA, Bakker A, Azim D, et al. Lamin A/C mutation is independently associated with an increased risk of arterial and venous thromboembolic complications. *Int J Cardiol.* 2013;168(1):472-477. doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.118
 159. Parks SB, Kushner JD, Nauman D, et al. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2008;156(1):161-169. doi:10.1016/j.ahj.2008.01.026
 160. van Tintelen JP, Tio RA, Kerstjens-Frederikse WS, et al. Severe myocardial fibrosis caused by a deletion of the 5' end of the lamin A/C gene. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(25):2430-2439. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.063
 161. Morales A, Kinnammon DD, Jordan E, et al. Variant Interpretation for Dilated Cardiomyopathy: Refinement of the American College of Medical Genetics and Genomics/ClinGen Guidelines for the DCM Precision Medicine Study. *Circ Genom Precis Med.* 2020;13(2):e002480. doi:10.1161/CIRCGEN.119.002480
 162. Rosenbaum AN, Agre KE, Pereira NL. Genetics of dilated cardiomyopathy: practical implications for heart failure management. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(5):286-297. doi:10.1038/s41569-019-0284-0

163. McNair WP, Ku L, Taylor MR, et al. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia. *Circulation*. 2004;110(15):2163-2167. doi:10.1161/01.CIR.0000144458.58660.BB
164. Sedaghat-Hamedani F, Rebs S, El-Battrawy I, et al. Identification of SCN5a p.C335R Variant in a Large Family with Dilated Cardiomyopathy and Conduction Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12990. Published 2021 Nov 30. doi:10.3390/ijms222312990
165. Asatryan B. Cardiac Sodium Channel Dysfunction and Dilated Cardiomyopathy: A Contemporary Reappraisal of Pathophysiological Concepts. *J Clin Med*. 2019;8(7):1029. Published 2019 Jul 12. doi:10.3390/jcm8071029
166. van Rijsingen IA, van der Zwaag PA, Groeneweg JA, et al. Outcome in phospholamban R14del carriers: results of a large multicentre cohort study. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(4):455-465. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000374
167. Haas J, Frese KS, Peil B, et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015;36(18):1123-35a. doi:10.1093/eurheartj/ehu301
168. Elliott P, O'Mahony C, Syrris P, et al. Prevalence of desmosomal protein gene mutations in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(4):314-322. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.937805M
169. Gigli M, Merlo M, Graw SL, et al. Genetic Risk of Arrhythmic Phenotypes in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(11):1480-1490. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.072
170. Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell*. 2000;6(1):11-22. doi:10.1016/s1097-2765(00)00003-4
171. Parker F, Tang AAS, Rogers B, et al. Affimers targeting proteins in the cardiomyocyte Z-disc: Novel tools that improve imaging of heart tissue. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1094563. Published 2023 Feb 14. doi:10.3389/fcvm.2023.1094563
172. Taylor MR, Slavov D, Ku L, et al. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2007;115(10):1244-1251. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.646778

173. Gigli M, Merlo M, Graw SL, et al. Genetic Risk of Arrhythmic Phenotypes in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(11):1480-1490. doi:10.1016/j.jacc.2019.06.072
174. Qu HQ, Feldman AM, Hakonarson H. Genetics of BAG3: A Paradigm for Developing Precision Therapies for Dilated Cardiomyopathies. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(23):e027373. doi:10.1161/JAHA.122.027373
175. Hey TM, Rasmussen TB, Madsen T, Aagaard MM, Harbo M, Molgaard H, Moller JE, Eiskjaer H, Mogensen J, Pathogenic RBM20-variants are associated with a severe disease expression in male patients with dilated cardiomyopathy. *Circ. Heart Fail*. 12, e005700 (2019).
176. Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, de Andrade M, Pellikka PA, Rodeheffer RJ, Michels VV, Olson TM, Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol*. 54, 930–941 (2009).
177. Watanabe T, Kimura A, Kuroyanagi H, Alternative splicing regulator RBM20 and cardiomyopathy. *Front. Mol. Biosci*. 5, 105 (2018)
178. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
179. Fatkin D, Huttner IG, Kovacic JC, Seidman JG, Seidman CE. Precision Medicine in the Management of Dilated Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(23):2921-2938. doi:10.1016/j.jacc.2019.10.011
180. Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, Monaghan KG, Rehder CW, Chao EC; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med*. 2019 Jun;21(6):1267-1270. doi: 10.1038/s41436-019-0478-1. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31015575; PMCID: PMC6559819.
181. Mersch J, Brown N, Pirzadeh-Miller S, et al. Prevalence of Variant Reclassification Following Hereditary Cancer Genetic Testing. *JAMA*. 2018;320(12):1266-1274. doi:10.1001/jama.2018.13152

182. Vallverdú-Prats M, Alcalde M, Sarquella-Brugada G, et al. Rare Variants Associated with Arrhythmogenic Cardiomyopathy: Reclassification Five Years Later. *J Pers Med.* 2021;11(3):162. Published 2021 Feb 26. doi:10.3390/jpm11030162
183. Sarquella-Brugada G, Fernandez-Falgueras A, Cesar S, et al. Clinical impact of rare variants associated with inherited channelopathies: a 5-year update. *Hum Genet.* 2022;141(10):1579-1589. doi:10.1007/s00439-021-02370-4
184. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Fernandez-Falgueras A, et al. Reanalysis and reclassification of rare genetic variants associated with inherited arrhythmogenic syndromes. *EBioMedicine.* 2020;54:102732. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102732
185. ACMG Board of Directors. Clinical utility of genetic and genomic services: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med.* 2015;17(6):505-507. doi:10.1038/gim.2015.41
186. Chen E, Facio FM, Aradhya KW, et al. Rates and Classification of Variants of Uncertain Significance in Hereditary Disease Genetic Testing. *JAMA Netw Open.* 2023;6(10):e2339571. Published 2023 Oct 2. doi:10.1001/jamanetworkopen.2023.39571
187. Martínez-Barrios E, Cesar S, Cruzalegui J, et al. Clinical Genetics of Inherited Arrhythmogenic Disease in the Pediatric Population. *Biomedicines.* 2022;10(1):106. Published 2022 Jan 5. doi:10.3390/biomedicines10010106
188. Martínez-Barrios E, Sarquella-Brugada G, Pérez-Serra A, et al. Discerning the Ambiguous Role of Missense TTN Variants in Inherited Arrhythmogenic Syndromes. *J Pers Med.* 2022;12(2):241. Published 2022 Feb 8. doi:10.3390/jpm12020241
189. Glazer AM, Wada Y, Li B, et al. High-Throughput Reclassification of SCN5A Variants. *Am J Hum Genet.* 2020;107(1):111-123. doi:10.1016/j.ajhg.2020.05.015
190. Gesteland, RF, Cech, TR y Atkins, JF (eds) (2006) *El mundo del RNA*, 3ªed. Prensa del laboratorio Cold Spring Harbor
191. Jacob, F. y Monod, J. (1961) Mecanismos reguladores genéticos en la síntesis de proteínas. *J. Mol. Biol.*,3,318–356.

192. Salzman J, Gawad C, Wang PL, Lacayo N, Brown PO. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS One*. 2012;7(2):e30733. doi:10.1371/journal.pone.0030733.
193. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-388. doi:10.1038/nature11993
194. Sasidharan R, Gerstein M. Genomics: protein fossils live on as RNA published correction appears in *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1001. *Nature*. 2008;453(7196):729-731. doi:10.1038/453729a
195. de Gonzalo-Calvo D, Vea A, Bär C, et al. Circulating non-coding RNAs in biomarker-guided cardiovascular therapy: a novel tool for personalized medicine?. *Eur Heart J*. 2019;40(20):1643-1650. doi:10.1093/eurheartj/ehy234
196. Motohashi N, Alexander MS, Shimizu-Motohashi Y, Myers JA, Kawahara G, Kunkel LM. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. *J Cell Sci*. 2013 Jun 15;126(Pt 12):2678-91. doi: 10.1242/jcs.119966. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23606743; PMCID: PMC3687700
197. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;109(6):670-679. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.248880
198. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589(Pt 16):3983-3994. doi:10.1113/jphysiol.2011.213363
199. de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A, et al. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2015;119(2):124-134. doi:10.1152/japplphysiol.00077.2015
200. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
201. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-1741. doi:10.1373/clinchem.2010.147405
202. de Gonzalo-Calvo D, Pérez-Boza J, Curado J, Devaux Y; EU-CardioRNA COST Action CA17129. Challenges of microRNA-based biomarkers in clinical

- application for cardiovascular diseases. *Clin Transl Med.* 2022 Feb;12(2):e585. doi: 10.1002/ctm2.585. PMID: 35167732; PMCID: PMC8846372.
203. Shah AM, Giacca M. Small non-coding RNA therapeutics for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2022;43(43):4548-4561. doi:10.1093/eurheartj/ehac463
 204. Swerdlow DI, Rider DA, Yavari A, Lindholm MW, Campion GV, Nissen SE. Treatment and prevention of lipoprotein(a)-mediated cardiovascular disease: the emerging potential of RNA interference therapeutics. *Cardiovasc Res* 2022;118:1218–1231.
 205. Cupido AJ, Kastelein JJP. Inclisiran for the treatment of hypercholesterolaemia: implications and unanswered questions from the ORION trials. *Cardiovasc Res.* 2020;116(11):e136-e139. doi:10.1093/cvr/cvaa212.
 206. Raal FJ, Kallend D, Ray KK, et al. Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2020;382(16):1520-1530. doi:10.1056/NEJMoa1913805.
 207. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. El gen heterocrónico lin-4 de *C. elegans* codifica RNA pequeños con complementariedad antisentido con lin-14. *Celda* (1993) 75:843–54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-Y
 208. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. La regulación postranscripcional del gen heterocrónico lin-14 por lin-4 media la formación de patrones temporales en *C. elegans* . *Celda* (1993) 75:855–62. doi: 10.1016/0092-8674(93)90530-4
 209. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservación de la secuencia y expresión temporal del RNA regulador heterocrónico let-7. *Naturaleza* (2000) 408:86–9. doi: 10.1038/35040556
 210. Li SC, Chan WC, Hu LY, Lai CH, Hsu CN, Lin WC. Identificación de microRNA homólogos en 56 genomas animales. *Genómica* (2010) 96:1–9. doi: 10.1016/j.ygeno.2010.03.009
 211. Friedlander MR, Lizano E, Houben AJ, Bezdan D, Báñez-Coronel M, Kudla G, et al. Evidencia de la biogénesis de más de 1000 nuevos microRNA humanos. *Genoma Biol.* (2014) 15:R57. doi: 10.1186/gb-2014-15-4-r57.
 212. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D109-D111. doi:10.1093/nar/gkh023
 213. Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays Biochem.* 2013;54:29-38. doi:10.1042/bse0540029

214. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(23):9667-9672. doi:10.1073/pnas.0703820104
215. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
216. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 2012;336(6078):237-240. doi:10.1126/science.1215691
217. Gu W, Xu Y, Xie X, Wang T, Ko JH, Zhou T. The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA*. 2014 Sep;20(9):1369-75. doi: 10.1261/rna.044792.114. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25002673; PMCID: PMC4138320.
218. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(3):311-330. doi:10.1002/wrna.121
219. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem*. 2016;51(3-4):33-49. doi:10.1016/j.proghi.2016.06.001
220. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS One*. 2013;8(11):e79467. Published 2013 Nov 12. doi:10.1371/journal.pone.0079467
221. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007; 318:1931–1934
222. Chen X, Liang H, Zhang J, et al. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012;22:125–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>.)
223. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [published correction appears in *PLoS One*. 2010;5(3) doi: 10.1371/annotation/b15ca816-7b62-4474-a568-6b60b8959742]. *PLoS One*. 2008;3(11):e3694. doi:10.1371/journal.pone.0003694.
224. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?. *Circ Res*. 2012;110(3):483-495. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247452

225. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* (2004) 432:231–5. doi: 10.1038/nature03049
226. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. El complejo Drosha-DGCR8 en el procesamiento primario de microRNA. *Desarrollo de genes*. (2004) 18:3016–27. doi: 10.1101/gad.1262504.
227. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):78. Published 2016 Jan 9. doi:10.3390/ijms17010078
228. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* (2009) 326:1275–9. doi: 10.1126/science.1178705
229. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* (2004) 118:57–68. doi: 10.1016/j.cell.2004.06.017.
230. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol*. (2010) 17:17–23. doi: 10.1038/nsmb.1733.
231. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. Published 2018 Aug 3. doi:10.3389/fendo.2018.00402
232. Ellwanger DC, Buttner FA, Mewes HW, Stumpflen V. The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics* (2011) 27:1346–50. doi: 10.1093/bioinformatics/btr149
233. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
234. Kalayinia S, Arjmand F, Maleki M, Malakootian M, Singh CP. MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease. *Cardiovasc Pathol*. 2021;50:107296. doi:10.1016/j.carpath.2020.107296
235. Eipper-Mains JE, Eipper BA, Mains RE. Global Approaches to the Role of miRNAs in Drug-Induced Changes in Gene Expression. *Front Genet*. 2012;3:109. Published 2012 Jun 13. doi:10.3389/fgene.2012.00109

236. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2010 Oct;2(4):161-79. PMID: 23407304; PMCID: PMC3558168.
237. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol*. 2018;233(3):2007-2018. doi:10.1002/jcp.25854
238. Searles CD. MicroRNAs and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep*. 2024;26(2):51-60. doi:10.1007/s11886-023-02014-1
239. Nagy O, Baráth S, Ujfalusi A. The role of microRNAs in congenital heart disease. *EJIFCC*. 2019 Jun 24;30(2):165-178. PMID: 31263391; PMCID: PMC6599193.
240. Chen JF, Murchison EP, Tang R, et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):2111-2116. doi:10.1073/pnas.0710228105
241. Jayawardena TM, Egemazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res* 2012;110:1465–1473.
242. Fathi M, Gharakhanlou R, Rezaei R. The Changes of Heart miR-1 and miR-133 Expressions following Physiological Hypertrophy Due to Endurance Training. *Cell J*. 2020 Jul;22(Suppl 1):133-140. doi: 10.22074/cellj.2020.7014. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32779443; PMCID: PMC7481891.
243. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2464. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-13949. doi:10.1073/pnas.0506654102
244. Alcalde M, Toro R, Bonet F, et al. Role of microRNAs in arrhythmogenic cardiomyopathy: translation as biomarkers into clinical practice. *Transl Res*. 2023;259:72-82. doi:10.1016/j.trsl.2023.04.003
245. Harling L, Lambert J, Ashrafian H, Darzi A, Gooderham NJ, Athanasiou T. Elevated serum microRNA 483-5p levels may predict patients at risk of post-operative atrial fibrillation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2017;51(1):73-78. doi:10.1093/ejcts/ezw245
246. Calore M, Lorenzon A, Vitiello L, et al. A novel murine model for arrhythmogenic cardiomyopathy points to a pathogenic role of Wnt signalling

- and miRNA dysregulation. *Cardiovasc Res.* 2019;115(4):739-751. doi:10.1093/cvr/cvy253
247. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2011;17(11):923-929. doi:10.1016/j.cardfail.2011.07.012
 248. Wang H, Chen F, Tong J, et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for dilated cardiomyopathy. *Cardiol J.* 2017;24(1):65-73. doi:10.5603/CJ.a2016.0097
 249. Alonso-Villa E, Bonet F, Hernandez-Torres F, et al. The Role of MicroRNAs in Dilated Cardiomyopathy: New Insights for an Old Entity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21):13573. Published 2022 Nov 5. doi:10.3390/ijms232113573
 250. Di Gregoli K, Mohamad Anuar NN, Bianco R, et al. c of TIMP-3 and Elastin. *Circ Res.* 2017;120(1):49-65. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309321
 251. Gaber MA, Omar OHM, El-Deek SEM, Hassan AKM, Mahmoud MS, Meki AMA. Copeptin, miRNA-208, and miRNA-499 as New Biomarkers for Early Detection of Acute Coronary Syndrome [published correction appears in *Appl Biochem Biotechnol.* 2021 Nov 9;]. *Appl Biochem Biotechnol.* 2022;194(3):1193-1205. doi:10.1007/s12010-021-03695-6
 252. Lewandowski P, Goławski M, Baron M, Reichman-Warmusz E, Wojnicz R. A Systematic Review of miRNA and cfDNA as Potential Biomarkers for Liquid Biopsy in Myocarditis and Inflammatory Dilated Cardiomyopathy. *Biomolecules.* 2022;12(10):1476. Published 2022 Oct 13. doi:10.3390/biom12101476
 253. Chiti E, Paolo MD, Turillazzi E, Rocchi A. MicroRNAs in Hypertrophic, Arrhythmogenic and Dilated Cardiomyopathy. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(9):1720. Published 2021 Sep 19. doi:10.3390/diagnostics11091720
 254. Aleshcheva G, Baumeier C, Harms D, Bock CT, Escher F, Schultheiss HP. MicroRNAs as novel biomarkers and potential therapeutic options for inflammatory cardiomyopathy. *ESC Heart Fail.* 2023;10(6):3410-3418. doi:10.1002/ehf2.14523;
 255. Hailu FT, Karimpour-Fard A, Neltner B, et al. Circulating and Cardiac Tissue miRNAs in Children with Dilated Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2023;10(9):391. Published 2023 Sep 11. doi:10.3390/jcdd10090391

256. Xue P, Liu Y, Wang H, Huang J, Luo M. miRNA-103-3p-Hlf regulates apoptosis and autophagy by targeting hepatic leukaemia factor in heart failure. *ESC Heart Fail.* 2023;10(5):3038-3045. doi:10.1002/ehf2.14493
257. Roncarati R, Viviani Anselmi C, Losi MA, et al. Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(9):920-927. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.041
258. Sommariva E, D'Alessandra Y, Farina FM, et al. MiR-320a as a Potential Novel Circulating Biomarker of Arrhythmogenic CardioMyopathy. *Sci Rep.* 2017;7(1):4802. Published 2017 Jul 6. doi:10.1038/s41598-017-05001-z
259. Toro R, Blasco-Turrión S, Morales-Ponce FJ, et al. Plasma microRNAs as biomarkers for Lamin A/C-related dilated cardiomyopathy. *J Mol Med (Berl).* 2018;96(8):845-856. doi:10.1007/s00109-018-1666-1
260. Chen T, Li Z, Tu J, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL-stimulated dendritic cells. *FEBS Lett.* 2011;585(4):657-663. doi:10.1016/j.febslet.2011.01.027
261. Simionescu N, Niculescu LS, Sanda GM, Margina D, Sima AV. Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Mol Biol Rep.* 2014;41(9):5765-5773. doi:10.1007/s11033-014-3449-2
262. Calvano J, Achanzar W, Murphy B, et al. Evaluation of microRNAs-208 and 133a/b as differential biomarkers of acute cardiac and skeletal muscle toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;312:53-60. doi:10.1016/j.taap.2015.11.015
263. Calderon-Dominguez M, Mangas A, Belmonte T, Quezada-Feijoo M, Ramos M, Toro R. Ischemic dilated cardiomyopathy pathophysiology through microRNA-16-5p. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2021;74(9):740-749. doi:10.1016/j.rec.2020.08.012
264. Wróblewski A, Strycharz J, Oszejka K, et al. Dysregulation of Inflammation, Oxidative Stress, and Glucose Metabolism-Related Genes and miRNAs in Visceral Adipose Tissue of Women with Type 2 Diabetes Mellitus. *Med Sci Monit.* 2023;29:e939299. Published 2023 Jul 9. doi:10.12659/MSM.939299
265. Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(23):2577-2584. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.945

266. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011;469(7330):336-342. doi:10.1038/nature09783
267. Friedman, RC; Farh, KK-H.; Burge, CB; Bartel, DP La mayoría de los ARNm de mamíferos son objetivos conservados de los microARN. *Genoma Res*. 2009 ,19 , 92-105.
268. Gabriel, AF; Costa, MC; Enguita, FJ Interacciones entre ARN reguladores no codificantes implicados en enfermedades cardiovasculares. *Adv. Exp. Medicina. Biol*. 2020 , 1229 , 79-104.
269. Friedländer, MR; Lizano, E.; Houben, AJS; Bezdan, D.; Báñez-Coronel, M.; Kudla, G.; Mateu-Huertas, E.; Kagerbauer, B.; González, J.; Chen, KC; et al. Evidencia de la biogénesis de más de 1000 nuevos microARN humanos. *Genoma Biol*. 2014 , 15 , R57
270. Urbich, C.; Kuehbach, A.; Dimmeler, S. Papel de los microARN en enfermedades vasculares, inflamación y angiogénesis. *Cardiovascular. Res*. 2008 , 79 , 581–588..
271. Wronska, A.; Kurkowska-Jastrzebska, I.; Santulli, G. Aplicación de microARN en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. *Acta Physiol. Oxf. ingles*. 2015 , 213 , 60–83..
272. Corsten MF, Heggermont W, Papageorgiou AP, et al. The microRNA-221/-222 cluster balances the antiviral and inflammatory response in viral myocarditis. *Eur Heart J*. 2015;36(42):2909-2919. doi:10.1093/eurheartj/ehv321.
273. Besler C, Urban D, Watzka S, et al. Endomyocardial miR-133a levels correlate with myocardial inflammation, improved left ventricular function, and clinical outcome in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(12):1442-1451. doi:10.1002/ejhf.579
274. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, et al. Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res*. 2009;105(6):585-594. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.200451.
275. Belmont PJ, Chen WJ, Thuerlauf DJ, Glembotski CC. Regulation of microRNA expression in the heart by the ATF6 branch of the ER stress response. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52(5):1176-1182. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.01.017
276. Zhou Y, Jia WK, Jian Z, et al. Downregulation of microRNA-199a-5p protects cardiomyocytes in cyanotic congenital heart disease by attenuating

- endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):2992-3000. doi:10.3892/mmr.2017.6934.
277. Fa H, Xiao D, Chang W, et al. MicroRNA-194-5p Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Endoplasmic Reticulum Stress by Targeting P21-Activated Kinase 2. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:815916. Published 2022 Mar 7. doi:10.3389/fcvm.2022.815916
278. Binder P, Wang S, Radu M, et al. Pak2 as a Novel Therapeutic Target for Cardioprotective Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Circ Res.* 2019;124(5):696-711. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.312829
279. Toro R, Pérez-Serra A, Mangas A, et al. miR-16-5p Suppression Protects Human Cardiomyocytes against Endoplasmic Reticulum and Oxidative Stress-Induced Injury. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1036. Published 2022 Jan 18. doi:10.3390/ijms23031036
280. Shibata R, Ouchi N, Ito M, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med.* 2004;10(12):1384-1389. doi:10.1038/nm1137
281. Dooley J, Garcia-Perez JE, Sreenivasan J, et al. The microRNA-29 Family Dictates the Balance Between Homeostatic and Pathological Glucose Handling in Diabetes and Obesity. *Diabetes.* 2016;65(1):53-61. doi:10.2337/db15-0770
282. Nie H, Pan Y, Zhou Y. Exosomal microRNA-194 causes cardiac injury and mitochondrial dysfunction in obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(4):3174-3179. doi:10.1016/j.bbrc.2018.08.113.
283. Silveira A, Gomes J, Roque F, Fernandes T, de Oliveira EM. MicroRNAs in Obesity-Associated Disorders: The Role of Exercise Training. *Obes Facts.* 2022;15(2):105-117. doi: 10.1159/000517849. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35051942; PMCID: PMC9021631.
284. Hijmans JG, Diehl KJ, Bammert TD, et al. Influence of Overweight and Obesity on Circulating Inflammation-Related microRNA. *Microna.* 2018;7(2):148-154. doi:10.2174/2211536607666180402120806
285. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor and the regulation of cellular cholesterol metabolism. *J Cell Sci Suppl.* 1985;3:131-137. doi:10.1242/jcs.1985.supplement_3.13

286. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1735(1):1-19. doi:10.1016/j.bbalip.2005.04.004
287. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):103-113. doi:10.1016/s1388-1981(00)00140-2.
288. Miśkowiec D, Lipiec P, Wierzbowska-Drabik K, et al. Association between microRNA-21 concentration and lipid profile in patients with acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126(1-2):48-57. doi:10.20452/pamw.3267
289. Shan ZX, Lin QX, Fu YH, et al. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;381(4):597-601. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.097.
290. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2016;37(39):2999-3058. doi:10.1093/eurheartj/ehw272
291. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010;376(9753):1670-1681. doi:10.1016/S0140-6736(10)61350-5
292. Naderi SH, Bestwick JP, Wald DS. Adherence to drugs that prevent cardiovascular disease: meta-analysis on 376,162 patients. *Am J Med*. 2012;125(9):882-7.e1. doi:10.1016/j.amjmed.2011.12.013
293. Vinci P, Panizon E, Tosoni LM, et al. Statin-Associated Myopathy: Emphasis on Mechanisms and Targeted Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11687. Published 2021 Oct 28. doi:10.3390/ijms222111687
294. Turner RM, Yin P, Hanson A, et al. Investigating the prevalence, predictors, and prognosis of suboptimal statin use early after a non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Clin Lipidol*. 2017;11(1):204-214. doi:10.1016/j.jacl.2016.12.007
295. Colantonio LD, Kent ST, Huang L, et al. Algorithms to Identify Statin Intolerance in Medicare Administrative Claim Data. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2016;30(5):525-533. doi:10.1007/s10557-016-6680-3

296. Leal K, Saavedra K, Rebolledo C, Salazar LA. MicroRNAs hsa-miR-618 and hsa-miR-297 Might Modulate the Pleiotropic Effects Exerted by Statins in Endothelial Cells Through the Inhibition of ROCK2 Kinase: in-silico Approach. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:704175. Published 2021 Aug 16. doi:10.3389/fcvm.2021.704175
297. Raucci A, Macrì F, Castiglione S, Badi I, Vinci MC, Zuccolo E. MicroRNA-34a: the bad guy in age-related vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(23):7355-7378. doi:10.1007/s00018-021-03979-4
298. Hirota T, Fujita Y, Ieiri I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2020;16(9):809-822. doi:10.1080/17425255.2020.1801634
299. Mohammadzadeh N, Montecucco F, Carbone F, Xu S, Al-Rasadi K, Sahebkar A. Statins: Epidrugs with effects on endothelial health?. *Eur J Clin Invest.* 2020;50(12):e13388. doi:10.1111/eci.13388
300. Mitchell CJ, D'Souza RF, Schierding W, et al. Identification of human skeletal muscle miRNA related to strength by high-throughput sequencing. *Physiol Genomics.* 2018;50(6):416-424. doi:10.1152/physiolgenomics.00112.2017
301. Liu D, Black BL, Derynck R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 2001;15(22):2950-2966. doi:10.1101/gad.925901
302. Fiorillo AA, Heier CR, Huang YF, Tully CB, Punga T, Punga AR. Estrogen Receptor, Inflammatory, and FOXO Transcription Factors Regulate Expression of Myasthenia Gravis-Associated Circulating microRNAs. *Front Immunol.* 2020;11:151. Published 2020 Feb 21. doi:10.3389/fimmu.2020.00151
303. Du L, Xu Z, Wang X, Liu F. Integrated bioinformatics analysis identifies microRNA-376a-3p as a new microRNA biomarker in patient with coronary artery disease. *Am J Transl Res.* 2020;12(2):633-648. Published 2020 Feb 15.
304. Min PK, Park J, Isaacs S, et al. Influence of statins on distinct circulating microRNAs during prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2016;120(6):711-720. doi:10.1152/japplphysiol.00654.2015.
305. Siracusa J, Koulmann N, Sourdrille A, et al. Phenotype-Specific Response of Circulating miRNAs Provides New Biomarkers of Slow or Fast Muscle Damage. *Front Physiol.* 2018;9:684. Published 2018 Jun 5. doi:10.3389/fphys.2018.00684

306. Fu CN, Song JW, Song ZP, et al. Excessive expression of miR-1a by statin causes skeletal injury through targeting mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Aging* (Albany NY). 2021;13(8):11470-11490. doi:10.18632/aging.202839
307. Bouitbir J, Daussin F, Charles AL, et al. Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle Nerve*. 2012;46(3):367-373. doi:10.1002/mus.23309
308. Lotteau S, Ivarsson N, Yang Z, Restagno D, Colyer J, Hopkins P, Weightman A, Himori K, Yamada T, Bruton J, Steele D, Westerblad H, Calaghan S. A Mechanism for Statin-Induced Susceptibility to Myopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Aug 26;4(4):509-523. doi: 10.1016/j.jacbts.2019.03.012. PMID: 31468006; PMCID: PMC6712048.
309. Oyabu M, Takigawa K, Mizutani S, et al. FOXO1 cooperates with C/EBP δ and ATF4 to regulate skeletal muscle atrophy transcriptional program during fasting. *FASEB J*. 2022;36(2):e22152. doi:10.1096/fj.202101385RR
310. Zhang H, Chi M, Chen L, et al. Linalool Prevents Cisplatin Induced Muscle Atrophy by Regulating IGF-1/Akt/FoxO Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:598166. Published 2020 Nov 30. doi:10.3389/fphar.2020.598166
311. Hillege MMG, Shi A, Galli RA, et al. Lack of Tgfb β 1 and Acvr1b synergistically stimulates myofibre hypertrophy and accelerates muscle regeneration. *Elife*. 2022;11:e77610. Published 2022 Mar 24. doi:10.7554/eLife.77610
312. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):19. Published 2011 May 4. doi:10.1186/2044-5040-1-19
313. Forbes K, Shah VK, Siddals K, Gibson JM, Aplin JD, Westwood M. Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation. *Mol Hum Reprod*. 2015 Jan;21(1):105-14. doi: 10.1093/molehr/gau093. Epub 2014 Oct 9. PMID: 25304981; PMCID: PMC4275043.
314. Jang HJ, Hong EM, Park SW, Byun HW, Koh DH, Choi MH, Kae SH, Lee J. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation. *Oncol Lett*. 2016 Jul;12(1):250-256. doi: 10.3892/ol.2016.4569. Epub 2016 May 13. PMID: 27347133; PMCID: PMC4906996.

315. Nordstrand A, Lundholm M, Larsson A, Lerner UH, Widmark A, Wikström P. Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor enhances effects of simvastatin on prostate cancer cells in co-culture with bone. *Cancer Microenviron.* 2013 Dec;6(3):231-40. doi: 10.1007/s12307-013-0129-z. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23335094; PMCID: PMC3855371.
316. Bonifacio A, Sanvee GM, Bouitbir J, Krähenbühl S. The AKT/mTOR signaling pathway plays a key role in statin-induced myotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(8):1841-1849. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.04.010
317. Mangas A, Pérez-Serra A, Bonet F, et al. A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(15):8146. Published 2022 Jul 24. doi:10.3390/ijms23158146
318. Apostolopoulou M, Corsini A, Roden M. The role of mitochondria in statin-induced myopathy. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(7):745-754. doi:10.1111/eci.12461
319. Auer J, Sinzinger H, Franklin B, Berent R. Muscle- and skeletal-related side-effects of statins: tip of the iceberg?. *Eur J Prev Cardiol.* 2016;23(1):88-110. doi:10.1177/2047487314550804
320. Mollazadeh H, Tavana E, Fanni G, et al. Effects of statins on mitochondrial pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2021;12(2):237-251. doi:10.1002/jcsm.12654
321. Szarek M, Bittner VA, Aylward P, et al. Lipoprotein(a) lowering by alirocumab reduces the total burden of cardiovascular events independent of low-density lipoprotein cholesterol lowering: ODYSSEY OUTCOMES trial. *Eur Heart J.* 2020;41(44):4245-4255. doi:10.1093/eurheartj/ehaa649
322. SCORE2-OP working group and ESC Cardiovascular risk collaboration. SCORE2-OP risk prediction algorithms: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions. *Eur Heart J.* 2021;42(25):2455-2467. doi:10.1093/eurheartj/ehab312
323. Ference BA, Majeed F, Penumetcha R, Flack JM, Brook RD. Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: a 2 × 2 factorial Mendelian randomization study. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(15):1552-1561. doi:10.1016/j.jacc.2015.02.020.

324. Jin JK, Blackwood EA, Azizi K, et al. ATF6 Decreases Myocardial Ischemia/Reperfusion Damage and Links ER Stress and Oxidative Stress Signaling Pathways in the Heart. *Circ Res.* 2017;120(5):862-875. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.310266
325. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2002;162(1):221-225. doi:10.1016/s0021-9150(01)00706-7
326. Lynch TL 4th, Sivaguru M, Velayutham M, et al. Oxidative Stress in Dilated Cardiomyopathy Caused by MYBPC3 Mutation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:424751. doi:10.1155/2015/424751
327. Rasool M, Malik A, Butt TT, et al. Implications of advanced oxidation protein products (AOPPs), advanced glycation end products (AGEs) and other biomarkers in the development of cardiovascular diseases. *Saudi J Biol Sci.* 2019;26(2):334-339. doi:10.1016/j.sjbs.2018.08.024
328. Prola A, Nichtova Z, Pires Da Silva J, et al. Endoplasmic reticulum stress induces cardiac dysfunction through architectural modifications and alteration of mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2019;115(2):328-342. doi:10.1093/cvr/cvy197
329. Chen Q, Samidurai A, Thompson J, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial dysfunction in aged hearts. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(11):165899. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165899
330. Peoples JN, Saraf A, Ghazal N, Pham TT, Kwong JQ. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Exp Mol Med.* 2019;51(12):1-13. Published 2019 Dec 19. doi:10.1038/s12276-019-0355-7
331. Chen Q, Thompson J, Hu Y, Das A, Lesnefsky EJ. Metformin attenuates ER stress-induced mitochondrial dysfunction. *Transl Res.* 2017;190:40-50. doi:10.1016/j.trsl.2017.09.003
332. Wang S, Hu B, Ding Z, et al. ATF6 safeguards organelle homeostasis and cellular aging in human mesenchymal stem cells. *Cell Discov.* 2018;4:2. Published 2018 Jan 5. doi:10.1038/s41421-017-0003-0]doi:10.1016/j.trsl.2017.09.003
333. Blackwood EA, Azizi K, Thuerauf DJ, et al. Pharmacologic ATF6 activation confers global protection in widespread disease models by reprogramming

- cellular proteostasis. *Nat Commun.* 2019;10(1):187. Published 2019 Jan 14. doi:10.1038/s41467-018-08129-2.
334. Guo FJ, Xiong Z, Lu X, Ye M, Han X, Jiang R. ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cell Signal.* 2014;26(2):332-342. doi:10.1016/j.cellsig.2013.11.018
 335. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell.* 2007;129(7):1337-1349. doi:10.1016/j.cell.2007.04.027
 336. Slomp A, Peperzak V. Role and Regulation of Pro-survival BCL-2 Proteins in Multiple Myeloma. *Front Oncol.* 2018;8:533. Published 2018 Nov 20. doi:10.3389/fonc.2018.00533
 337. Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol.* 2010;189(5):783-794. doi:10.1083/jcb.201003138].
 338. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(2):89-102. Published 2012 Jan 18. doi:10.1038/nrm3270
 339. Liu Y, Adachi M, Zhao S, et al. Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ.* 2009;16(6):847-857. doi:10.1038/cdd.2009.14
 340. Martinez-Barrios E, Sarquella-Brugada G, Perez-Serra A, et al. Reevaluation of ambiguous genetic variants in sudden unexplained deaths of a young cohort. *Int J Legal Med.* 2023;137(2):345-351. doi:10.1007/s00414-023-02951-0
 341. Stroeck SLVM, Hellebrekers D, Claes GRF, et al. Diagnostic and prognostic relevance of using large gene panels in the genetic testing of patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet.* 2023;31(7):776-783. doi:10.1038/s41431-023-01384-y
 342. Amendola LM, Muenzen K, Biesecker LG, et al. Variant Classification Concordance using the ACMG-AMP Variant Interpretation Guidelines across Nine Genomic Implementation Research Studies. *Am J Hum Genet.* 2020;107(5):932-941. doi:10.1016/j.ajhg.2020.09.011
 343. Landstrom AP, Chahal AA, Ackerman MJ, et al. Interpreting Incidentally Identified Variants in Genes Associated With Heritable Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association [published correction appears in *Circ Genom Precis Med.* 2023 Apr;16(2):e000093]. *Circ*

Genom Precis Med. 2023;16(2):e000092.
doi:10.1161/HCG.0000000000000092

344. Watts G, Newson AJ. Is there a duty to routinely reinterpret genomic variant classifications?. *J Med Ethics*. 2023;49(12):808-814. Published 2023 Nov 23. doi:10.1136/jme-2022-108864
345. McAfee Q, Chen CY, Yang Y, et al. Truncated titin proteins in dilated cardiomyopathy. *Sci Transl Med*. 2021;13(618):eabd7287. doi:10.1126/scitranslmed.abd7287