

## Abordagem de Bioinformática e Biologia de Sistemas para Identificar a Ligação Patogenética entre Insuficiência Cardíaca e Sarcopenia

*Bioinformatics and Systems Biology Approach to Identify the Pathogenetic Link between Heart Failure and Sarcopenia*

Rui Xu,<sup>1</sup>  Ling-ling Ma,<sup>1</sup> Shuai Cui,<sup>1</sup> Ling Chen,<sup>1</sup> Hong Xu<sup>1</sup>

Gerontology center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region,<sup>1</sup> Urumqi – China

### Resumo

**Fundamento:** Apesar das evidências crescentes de que pacientes com insuficiência cardíaca (IC) são suscetíveis à sarcopenia, o motivo da associação não é bem compreendido.

**Objetivo:** O objetivo deste estudo é explorar ainda mais o mecanismo molecular de ocorrência desta complicação.

**Métodos:** Conjuntos de dados de expressão gênica para HF (GSE57345) e Sarcopenia (GSE1428) foram obtidos do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). Genes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados usando pacotes 'edgeR' e "limma" de R, e suas funções foram analisadas usando Gene Ontology (GO) e a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). Redes de interação proteína-proteína (PPI) foram construídas e visualizadas usando Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) e Cytoscape. Os genes hub foram selecionados usando o plugin cytoHubba e validados com GSE76701 para IC e GSE136344 para Sarcopenia. As vias relacionadas e os mecanismos moleculares dos genes hub foram realizados pela análise de enriquecimento de genes (GSEA). As análises estatísticas foram realizadas no software R.  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

**Resultados:** Foram encontrados 114 DEGs comuns. As vias relacionadas ao fator de crescimento, secreção de insulina e cGMP-PKG estavam enriquecidas tanto na IC quanto na sarcopenia. Descobriu-se que CYP27A1, KCNJ8, PIK3R5, TIMP2, CXCL12, KIT e VCAM1 são genes hub significativos após validação com GSEA enfatizando a importância dos genes hub na regulação da resposta inflamatória.

**Conclusão:** Nosso estudo revela que a IC e a Sarcopenia compartilham vias e mecanismos patogênicos comuns. Estes achados podem sugerir novas direções para pesquisas futuras sobre a patogênese subjacente.

**Palavras-chave:** Sarcopenia; Insuficiência Cardíaca; Biologia Computacional; Genes.

### Abstract

**Background:** Despite increasing evidence that patients with heart failure (HF) are susceptible to sarcopenia, the reason for the association is not well understood.

**Objective:** The purpose of this study is to explore further the molecular mechanism of the occurrence of this complication.

**Methods:** Gene expression datasets for HF (GSE57345) and Sarcopenia (GSE1428) were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using 'edgeR' and "limma" packages of R, and their functions were analyzed using Gene Ontology (GO) and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Protein-protein interaction (PPI) networks were constructed and visualized using Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING) and Cytoscape. Hub genes were selected using the plugin cytoHubba and validation with GSE76701 for HF and GSE136344 for Sarcopenia. The related pathways and molecular mechanisms of the hub genes were performed by Gene set enrichment analysis (GSEA). The statistical analyses were performed using R software.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**Correspondência:** Hong Xu •

Nº. 91 Tianchi Road, Tianshan District, Urumqi, Xinjiang

E-mail: dengta2022@126.com

Artigo recebido em 13/12/2022, revisado em 15/07/2023, aceito em 16/08/2023

Editor responsável pela revisão: Gláucia Maria Moraes de Oliveira

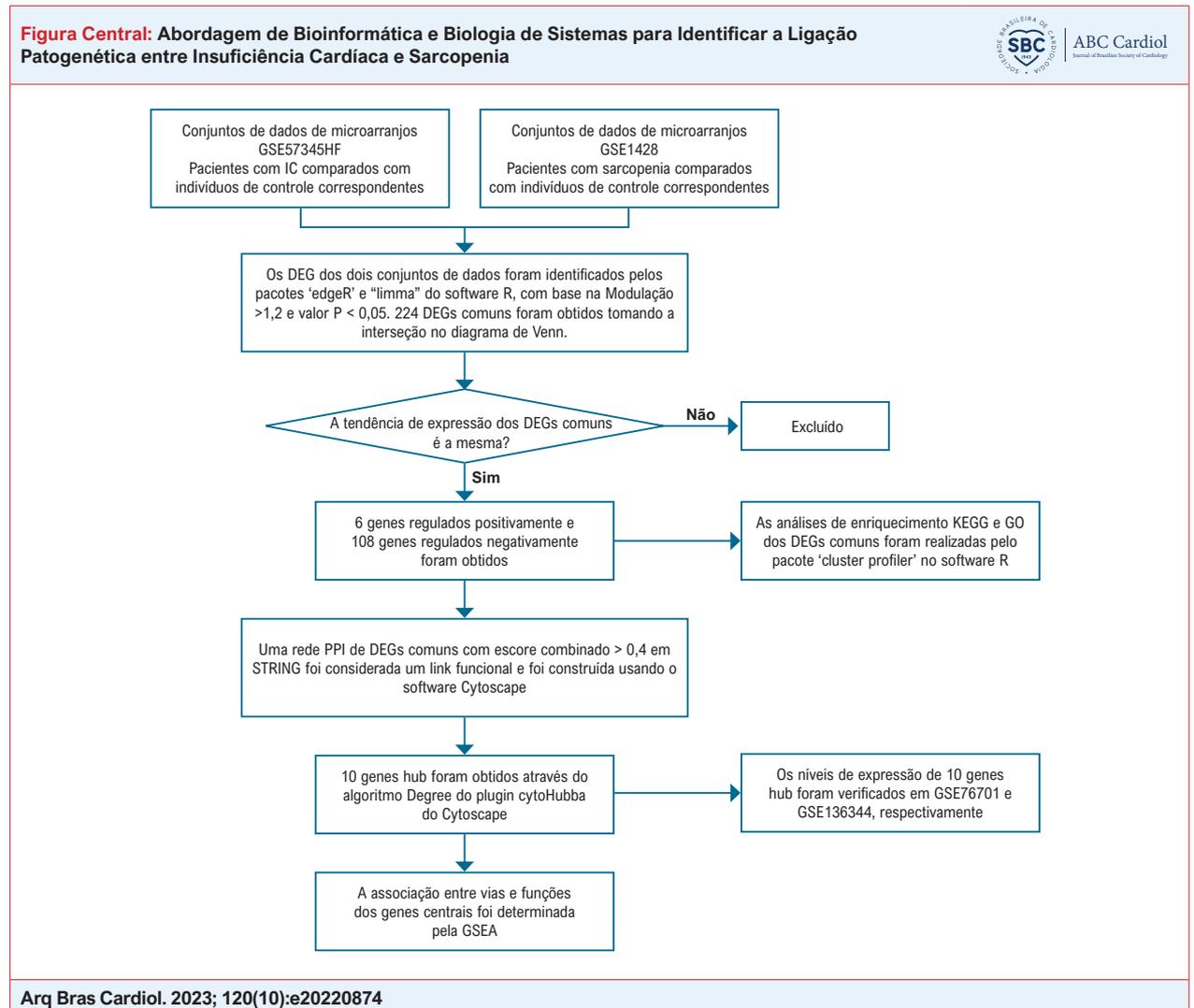
**DOI:** <https://doi.org/10.36660/abc.20220874>

**Results:** A total of 114 common DEGs were found. Pathways related to growth factor, Insulin secretion and cGMP-PKG were enriched in both HF and Sarcopenia. CYP27A1, KCNJ8, PIK3R5, TIMP2, CXCL12, KIT, and VCAM1 were found to be significant hub genes after validation, with GSEA emphasizing the importance of the hub genes in the regulation of the inflammatory response.

**Conclusion:** Our study reveals that HF and Sarcopenia share common pathways and pathogenic mechanisms. These findings may suggest new directions for future research into the underlying pathogenesis.

**Keywords:** Sarcopenia; Heart Failure; Computational Biology; Genes.

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



Fluxograma do projeto de pesquisa.

## Introdução

O envelhecimento global das populações em todo o mundo aumenta a prevalência de doenças relacionadas com a idade, como a IC, o que onera significativamente os sistemas de saúde.<sup>1</sup> A etiologia da IC é complexa e multifatorial, resultando na redução da capacidade funcional, muitas vezes com mau prognóstico. A sarcopenia foi identificada como um potencial preditor extracardíaco de pior prognóstico em pacientes com IC.<sup>2</sup>

A sarcopenia é um distúrbio progressivo em que os indivíduos afetados experimentam a perda progressiva e debilitante de massa muscular, contribuindo, em última análise, para altas taxas de fragilidade entre as populações mais idosas.<sup>3</sup> Está associada a um risco aumentado de quedas, osteoporose, perda de independência e aumento da mortalidade.<sup>4</sup> A perda muscular é frequentemente descrita como um tipo de sarcopenia secundária, às vezes sob o termo “caquexia” em pacientes com IC.<sup>5</sup> No entanto, embora

esta perda de massa muscular esquelética associada à idade continue a ser uma grande preocupação para pacientes idosos com IC, os mecanismos subjacentes à co-ocorrência de sarcopenia e IC são pouco compreendidos.

Uma análise de genes e vias comuns pode fornecer informações sobre a coexistência de IC e Sarcopenia. Assim, analisamos genes hub comuns a ambos os distúrbios e previmos as vias associadas a esses genes por meio de análise bioinformática quantitativa de dados disponíveis publicamente. Os achados podem fornecer uma nova visão sobre os mecanismos subjacentes à co-ocorrência destes dois distúrbios comuns.

## Métodos

### Desenho do estudo e coleta de dados

Gene Expression Omnibus (GEO) é um repositório público de dados genômicos funcionais que suporta envios de dados compatíveis com MIAME. Ferramentas são fornecidas para ajudar os usuários a consultarem e baixar experimentos e perfis de expressão genética selecionados. Os conjuntos de dados de expressão gênica foram obtidos do banco de dados GEO usando os termos de pesquisa “Heart Failure” e “Sarcopenia”.<sup>6,7</sup> Para inclusão, os critérios foram a presença de matrizes independentes com grandes tamanhos de amostra e dados humanos. Isso resultou na inclusão de dois conjuntos de dados, a saber, GSE573457 e GSE1428.<sup>8</sup> O conjunto de dados GSE57345 incluiu dados de sequenciamento de RNA de 177 pacientes com IC e 136 controles saudáveis da Filadélfia, enquanto o conjunto de dados GSE1428 continha dados de sequenciamento de RNA de amostras do músculo vasto lateral de 12 pacientes com Sarcopenia (70-80 anos) e 10 jovens controles saudáveis (19-25 anos) de Boston.

### Identificação de genes expressos diferencialmente com software R

Os dados de GSE57345 e GSE1428 foram normalizados, e os DEGs entre amostras de pacientes e controle foram identificados com o pacote R ‘edgeR’ e ‘limma’.<sup>9</sup> Modulações foram determinadas para a expressão dos genes individuais, com genes mostrando modulações  $> 1,2$  e valor  $p < 0,05$  classificado como DEGs. Genes comuns à Sarcopenia e IC foram obtidos pela sobreposição dos dois conjuntos de DEGs. O pacote R ‘Venn Diagram’ foi usado para obter seus DEGs comuns.<sup>10</sup> Em seguida, sobrepusemos os genes relacionados de HF e Sarcopenia para obter genes comuns para análise posterior.

### Anotação funcional e análise de enriquecimento de via

Uma análise funcional adicional dos DEGs comuns foi conduzida pela avaliação de anotações GO e vias enriquecidas em KEGG usando o pacote ‘cluster’ em R.<sup>11</sup> As anotações GO se enquadram em três categorias, a saber, processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). Valor de  $P < 0,05$  foi utilizado como limite de significância. Construção de rede PPI e identificação de genes hub

As redes PPI para os DEGs comuns foram então criadas em STRING com visualização pelo Cytoscape 3.9.0.<sup>12</sup> Escores de confiança  $> 0,4$  foram definidas para valores intermediários. O plugin Cytoscape, CytoHubba, foi utilizado para filtrar os genes hub na rede PPI usando o algoritmo de Degree.<sup>13</sup>

### Análise de enriquecimento de conjunto genético

O GSEA foi usada para determinar as associações entre vias e funções dos genes hub.<sup>14</sup> Os níveis de significância foram estabelecidos em valores nominais de  $p < 0,05$ , escores de enriquecimento normalizados (NES)  $> 1$  e valores  $q$  de taxa de falsos positivos (FDR)  $< 0,25$ .

### Validação da expressão de genes hub em outros conjuntos de dados

Os níveis de mRNA dos genes hub foram então verificados para GSE76701<sup>15</sup> e GSE136344.<sup>16</sup> GSE76701 continha 4 indivíduos com IC e 4 controles, enquanto GSE136344 continha 19 indivíduos com Sarcopenia e 11 controles. O teste T avaliou as diferenças entre os dois conjuntos de dados com um valor  $p < 0,05$  considerado significativo.

### Análise estatística

Este estudo conduziu todas as análises estatísticas usando o software R (versão 4.1.2; <https://www.r-project.org/>). A distribuição normal dos diferentes parâmetros foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t não pareado de Student. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

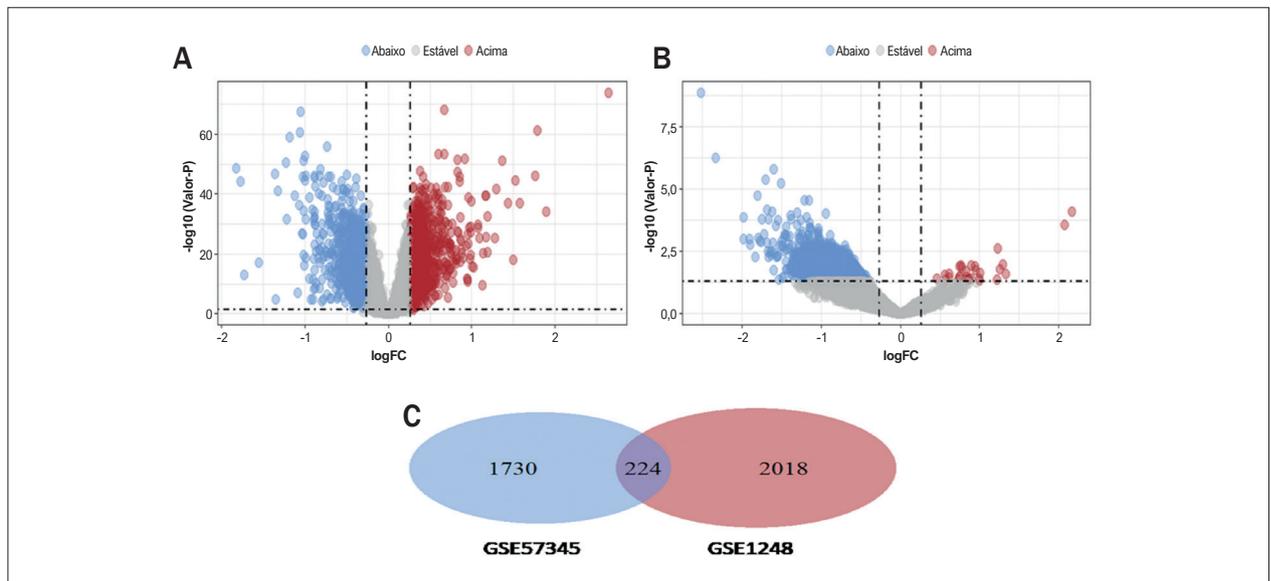
## Resultados

### Identificação de DEGs

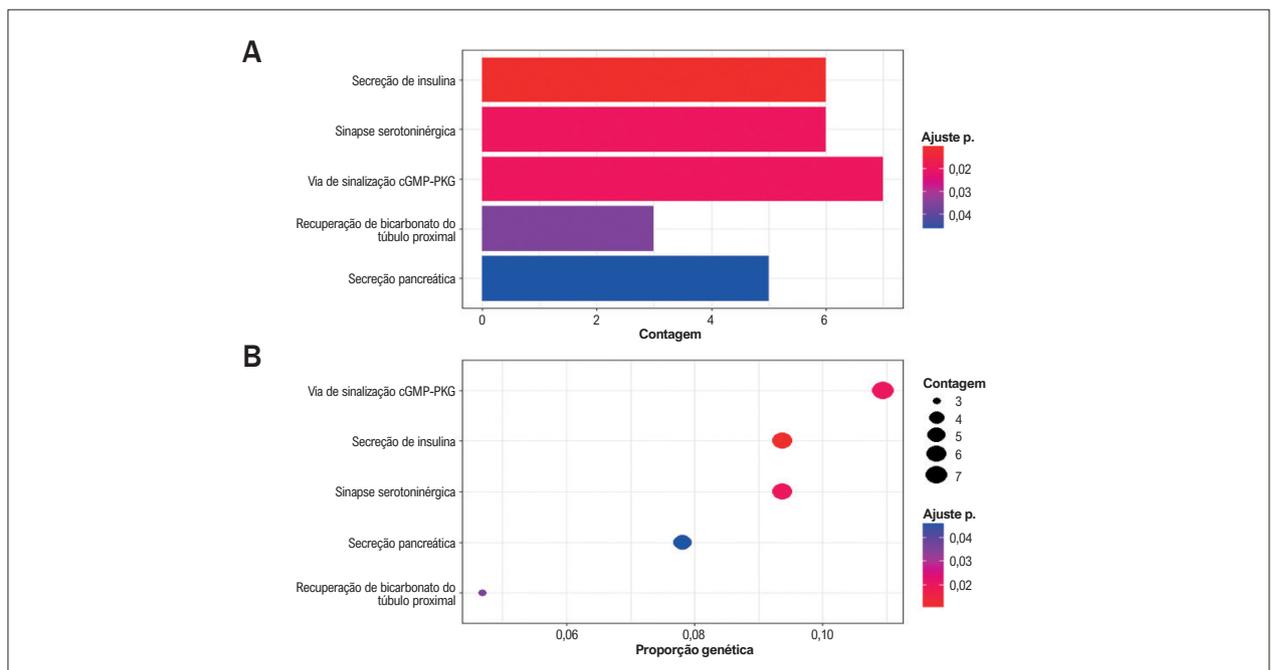
O fluxograma desta pesquisa foi apresentado na Figura Central. Todos os dados de dois conjuntos de dados independentes (GSE57345: HF e GSE1428: Sarcopenia) foram obtidos do GEO. Os dados do microarray foram normalizados e os DEGs foram identificados (1954 em GSE57345 e 2242 em GSE1428). Para melhor visualização, os DEGs para HF e Sarcopenia foram apresentados como volcano plots (Figuras 1A, B). 224 DEGs comuns a ambos os grupos foram identificados utilizando o diagrama de Venn (Figura 1C). Os genes que apresentaram diferentes tendências de expressão nos conjuntos de dados GSE57345 e GSE1428 foram descartados da análise, deixando 114 DEGs restantes.

### Análises de vias GO e KEGG

As funções desses DEGs comuns foram exploradas usando análises de enriquecimento GO e KEGG no pacote ‘cluster profiler’ no software R. A análise KEGG indicou enriquecimento dos DEGs em vias relacionadas ao fator de crescimento, secreção de insulina e cGMP-PKG (Figura 2A, 2B). As análises GO mostraram que os genes foram enriquecidos principalmente na via do fator de crescimento (Figura 3A, 3B).



**Figura 1** – Volcano plot e diagrama de Venn. A) Volcano plot de GSE57345. B) Volcano plot de GSE1248. Os genes regulados positivamente estão marcados em vermelho claro; genes regulados negativamente estão marcados em azul claro. C) Os dois conjuntos de dados mostraram uma sobreposição de 224 DEGs.



**Figura 2** – A) Com base no valor adj  $P$ , o gráfico de barras mostra as principais vias KEGG entre sarcopenia e IC. B) As principais vias de enriquecimento do KEGG foram apresentadas como mapas conceituais.

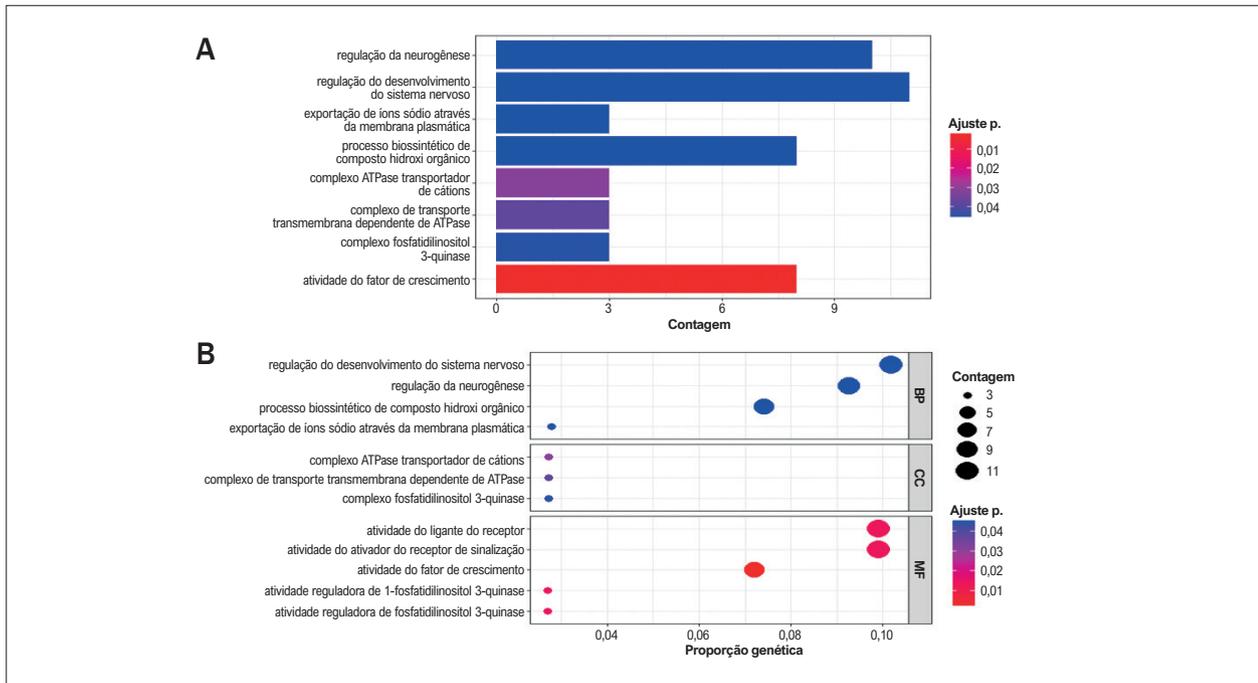
### Construção de rede PPI de DEGs comuns e identificação de genes hub

Os 114 DEGs comuns foram então importados para o STRING, com o arquivo STRING posteriormente importado para o Cytoscape para visualização. A Figura 4 mostra a rede PPI, na qual podem ser vistos 64 nós e 180 bordas. Os 10 principais genes hub foram encontrados usando o plugin CytoHubba e avaliados pelo grau de CYP27A1, KCNJ8,

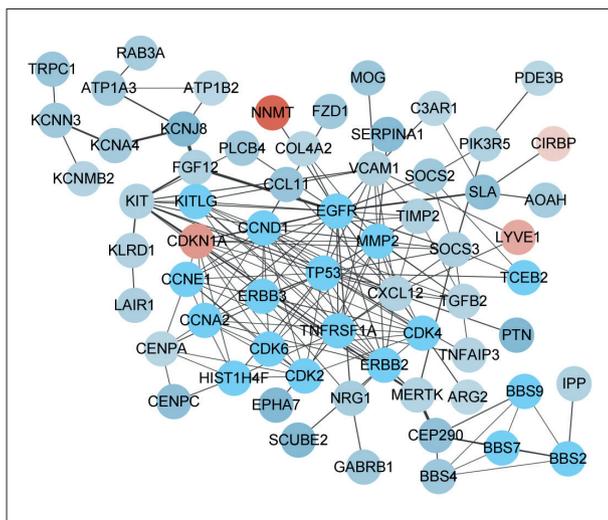
PIK3R5, TM7SF2, TIMP2, CXCL12, KIT, VCAM1, CYP46A1 e VCAM1 (Figura 5A).

### Resultados GSEA de genes hub

O GSEA foi então utilizado para examinar as possíveis funções dos genes hub, juntamente com a identificação de vias afetadas pela expressão diferencial dos genes, levando assim à identificação de vias associadas ao desenvolvimento



**Figura 3** – A) Com base no valor de ajuste  $P$ , o gráfico de barras mostra as principais vias GO entre sarcopenia e IC em relação à função molecular, processo biológico e componente celular. B) Os principais vias de enriquecimento do banco de dados GO foram apresentadas como mapas conceituais.



**Figura 4** – Diagrama de rede PPI. Vermelho indica genes regulados positivamente e azul claro indica genes regulados negativamente.

de IC e sarcopenia. Os resultados mostraram que os genes hub foram significativamente associados à ativação das vias de sinalização NF-kappa B e de sinalização TNF (Figura 5B).

### Validação de Genes Hub

Esses achados foram validados nos conjuntos de dados GEO GSE76701 para IC e GSE136344 para Sarcopenia. Em comparação com os controles, a interseção de 10

genes dos dois arquivos de matriz de conjuntos de dados revelou a regulação negativa significativa de 7 genes hub candidatos na IC (Figura 6A) e na Sarcopenia (Figura 6B). Esses genes hub foram CYP27A1, KCNJB, PIK3R5, TIMP2, CXCL12, KIT e VCAM1.

### Discussão

Há evidências de que muitos pacientes com IC apresentam fadiga, deficiência nutricional, diminuição da capacidade de caminhar e redução da força muscular, conhecida como sarcopenia. A sarcopenia está associada ao envelhecimento e é caracterizada pela redução da resistência física e da massa muscular.<sup>17</sup> A incidência de sarcopenia é maior em pacientes com IC em comparação com indivíduos controle da mesma idade, e esses pacientes frequentemente apresentam perda muscular mais rápida, o que compromete ainda mais sua função cardíaca.<sup>2</sup> É, portanto, provável que a IC e a sarcopenia possam ter uma patogênese comum ou sobreposta. A elucidação desses mecanismos patogênicos é necessária para o desenvolvimento de tratamentos adequados.

Este estudo identificou 114 DEGs que se sobrepunham entre as duas doenças. As redes PPI e a subsequente validação destes DEGs sobrepostos identificaram 7 genes significativos, nomeadamente, CYP27A1, KCNJB, PIK3R5, TIMP2, CXCL12, KIT e VCAM1. Como mostrado pelas análises de enriquecimento GO e KEGG, estes genes foram significativamente enriquecidos nas vias responsáveis pelo fator de crescimento, secreção de insulina e cGMP-PKG. As vias dos fatores de crescimento desempenham papéis importantes no desenvolvimento e manutenção da vasculatura, prevenindo o crescimento excessivo, a

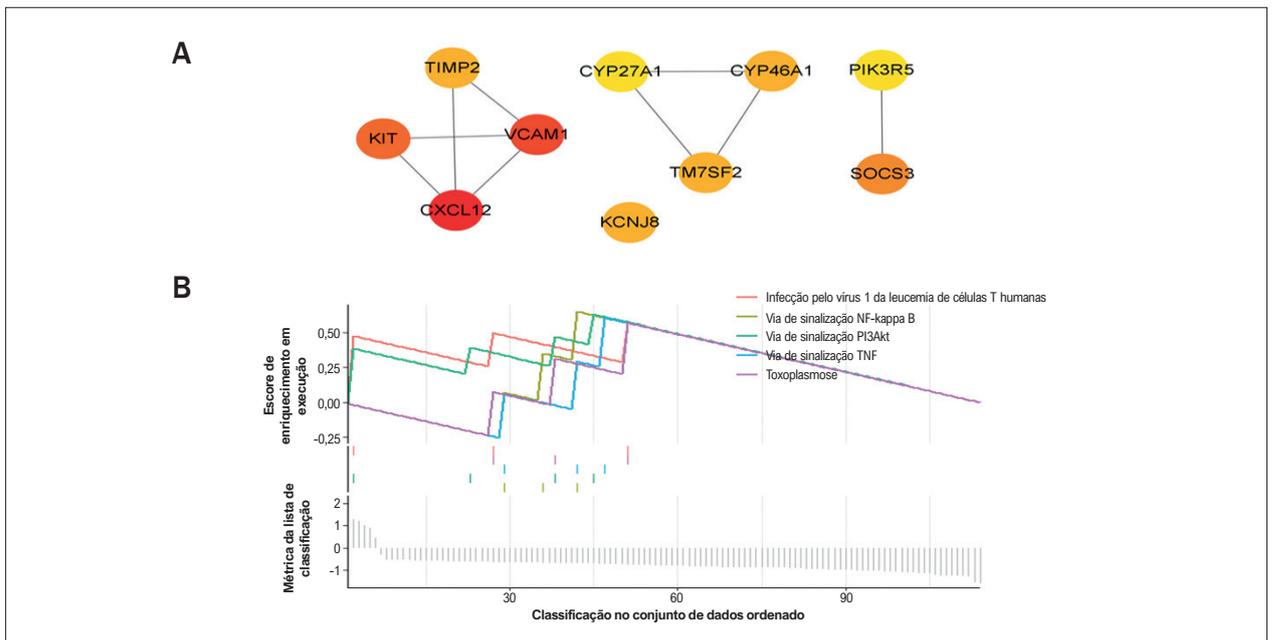


Figura 5 – A) Detecção de genes hub da rede PPIs de genes comuns. Os 10 genes hub destacados com base em seu grau. B) GSEA dos genes hub.

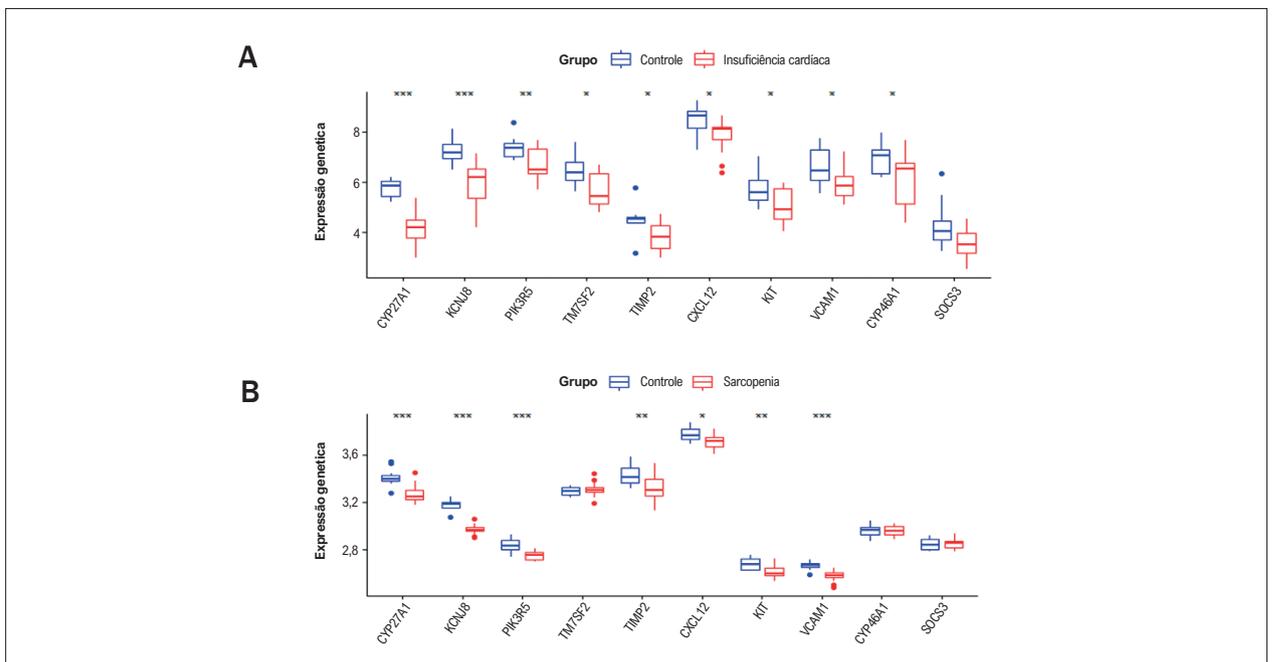


Figura 6 – Validação de genes hub. A) Os genes Hub foram validados em GSE76701 para IC. B) Os genes Hub foram validados em GSE136344 para Sarcopenia. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

remodelação e a desestabilização por vários mecanismos de feedback.<sup>18</sup> A via de secreção da insulina é fundamental para o metabolismo da glicose, e sua desregulação está associada ao diabetes, um conhecido fator de risco para IC e Sarcopenia.<sup>19</sup> A via cGMP-PKG está envolvida na disfunção diastólica, associada à rigidez diastólica, relaxamento lento e redução da elasticidade dos cardiomiócitos.<sup>20</sup>

A GSEA indicou a associação de vias relacionadas à inflamação, incluindo as vias de sinalização NF-kappa B e TNF, com a patogênese da IC e da sarcopenia. Ambos os distúrbios estão associados à inflamação crônica, como observado nos níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Estes aumentam a adiposidade visceral e reduzem a massa e a força

muscular, aumentando o risco de IC.<sup>21,22</sup> Nossos achados sugerem que os genes hub estão intimamente envolvidos com processos relacionados à inflamação mediados pelas vias de sinalização identificadas e contribuem para o desenvolvimento de IC e Sarcopenia. Considerando os genes hub, o CYP27A1 é um membro da família do citocromo P450 responsável por regular a homeostase do colesterol, convertendo o excesso de colesterol em ácido biliar.<sup>23</sup> Ele também catalisa a 25-hidroxilação da vitamina D3, resultando na ativação funcional.<sup>24</sup> Tanto a homeostase do colesterol quanto a vitamina D os níveis têm sido associados à patogênese e aos resultados da IC e da sarcopenia.<sup>25,26</sup> O KCNJ8 é expresso pela maioria das células de mamíferos, onde regula os potenciais de membrana; níveis elevados são encontrados no coração, onde, juntamente com o SER2, forma um canal de potássio dependente de ATP. KCNJ8 tem sido associado a distúrbios cardiovasculares, incluindo vasomoção coronariana anormal e disfunção microvascular, doença cardíaca isquêmica e diabetes tipo 2.<sup>27-29</sup> PIK3R5 está envolvido em muitos processos celulares, incluindo crescimento, proliferação, diferenciação, motilidade, tráfego intracelular e sobrevivência. Também foi proposto como biomarcador para hipertensão e diabetes mellitus.<sup>30,31</sup> Foi relatado que níveis elevados de pressão arterial e glicose estão associados ao aumento da incidência de IC e sarcopenia.<sup>32,33</sup> TIMP2, juntamente com outros membros da família de genes TIMP, inibem metaloproteinases de matriz (MMPs).<sup>34</sup> MMPs, incluindo MMP-1, -2, -3, -9 e -19, são peptidases que degradam a matriz extracelular. TIMP2 e essas MMPs podem controlar a homeostase da matriz, modulando, especialmente, a produção e degradação de colágeno, que é conhecido por desempenhar um papel importante na patogênese da IC.<sup>35</sup> A interrupção do equilíbrio MMP/TIMP2 no envelhecimento dos músculos esqueléticos afeta adversamente a função metabólica de a matriz extracelular e a produção excessiva de colágeno; estes, por sua vez, influenciam a massa e a função muscular e podem levar à sarcopenia.<sup>36</sup> CXCL12 é um ligante de um receptor acoplado à proteína G e é conhecido por estar envolvido em várias atividades celulares, incluindo respostas imunológicas e inflamatórias, embriogênese, homeostase de tecido e carcinogênese e metástase.<sup>37</sup> O CXCL12 é relatado como um elo importante entre inflamação e fibrose e foi proposto como um alvo para o tratamento da IC.<sup>38</sup> Na sarcopenia, o CXCL12 influencia o desenvolvimento e funcionamento de osteoblastos, osteoclastos, células satélites e mioblastos, todos necessários para manter a homeostase muscular.<sup>39</sup> O KIT codifica um receptor tirosina quinase que regula a proliferação e sobrevivência celular, bem como o desenvolvimento de mastócitos, gametogênese e melanogênese.<sup>40</sup> O KIT é supostamente fortemente expresso no tecido cardíaco e parece ser envolvido na IC.<sup>41</sup> O KIT promove a fosforilação de MAPK1/ERK2 durante a mitofagia.<sup>42</sup> As interrupções na mitofagia, a degradação autofágica de mitocôndrias disfuncionais, estão associadas à atrofia das fibras musculares na sarcopenia.<sup>43</sup> VCAM1 pertence à superfamília das imunoglobulinas e codifica uma sialoglicoproteína expressa em superfícies endoteliais após ativação de citocinas. Está envolvido na resposta

imune e na promoção do direcionamento das células imunes para locais de inflamação.<sup>44</sup> As vias imunológicas e inflamatórias estão associadas à patogênese da sarcopenia e da IC.<sup>21,22</sup> Assim, os genes hub identificados e suas vias de sinalização associadas provavelmente serão intimamente envolvidos na patogênese da IC e da sarcopenia.

No entanto, este estudo tem várias limitações. O estudo retrospectivo concentrou-se em um conjunto de dados de expressão gênica com um tamanho de amostra relativamente pequeno, levando potencialmente a um viés de seleção. Também é possível que genes significativos tenham sido negligenciados durante as diferentes etapas do processo de seleção. Investigações futuras devem utilizar amostras maiores e avaliar modelos celulares e animais para verificação.

## Conclusões

Foram identificados DEGs comuns associados à IC e à sarcopenia, e suas funções e interações foram analisadas por redes de enriquecimento e PPI. Os resultados indicaram que ambas as doenças tinham muitas vias patogênicas comuns, possivelmente sob o controle dos genes hub identificados, ilustraram o possível mecanismo da sarcopenia secundária à IC e identificaram novos genes candidatos que poderiam ser utilizados como biomarcadores ou como potenciais alvos terapêuticos.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Xu R, Xu H; Obtenção de dados e Análise e interpretação dos dados: Xu R, Ling-ling M; Redação do manuscrito: Xu R; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Cui S, Chen L.

### Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo.

### Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação acadêmica

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

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region sob o número de protocolo KY2022031398. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

## Referências

1. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of Heart Failure. *Eur J Heart Fail.* 2020;22(8):1342-56. doi: 10.1002/ejhf.1858.
2. Konishi M, Kagiyama N, Kamiya K, Saito H, Saito K, Ogasahara Y, et al. Impact of Sarcopenia on Prognosis in Patients with Heart Failure with Reduced and Preserved Ejection Fraction. *Eur J Prev Cardiol.* 2021;28(9):1022-9. doi: 10.1093/eurjpc/zwaa117.
3. Priyadarini N, Nanda P, Devi S, Mohapatra S. Sarcopenia: An Age-Related Multifactorial Disorder. *Curr Aging Sci.* 2022;15(3):209-17. doi: 10.2174/1874609815666220304194539.
4. Lyu W, Tanaka T, Son BK, Yoshizawa Y, Akishita M, Iijima K. Associations of Nutrition-Related, Physical, and Social Factors and Their Combinations with Sarcopenia in Community-Dwelling Older Adults: Kashiwa Cohort Study. *Nutrients.* 2022;14(17):3544. doi: 10.3390/nu14173544.
5. Canteri AL, Gusmon LB, Zanini AC, Nagano FE, Rabito EI, Petterle RR, et al. Sarcopenia in Heart Failure with Reduced Ejection Fraction. *Am J Cardiovasc Dis.* 2019;9(6):116-26.
6. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI Gene Expression and Hybridization Array Data Repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):207-10. doi: 10.1093/nar/30.1.207.
7. Liu Y, Morley M, Brandimarto J, Hannehalli S, Hu Y, Ashley EA, et al. RNA-Seq Identifies Novel Myocardial Gene Expression Signatures of Heart Failure. *Genomics.* 2015;105(2):83-9. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.12.002.
8. Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, et al. Identification of a Molecular Signature of Sarcopenia. *Physiol Genomics.* 2005;21(2):253-63. doi: 10.1152/physiolgenomics.00249.2004.
9. Liu S, Wang Z, Zhu R, Wang F, Cheng Y, Liu Y. Three Differential Expression Analysis Methods for RNA Sequencing: limma, EdgeR, DESeq2. *J Vis Exp.* 2021;(175). doi: 10.3791/62528.
10. Chen H, Boutros PC. VennDiagram: A Package for the Generation of Highly-Customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:35. doi: 10.1186/1471-2105-12-35.
11. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OMICS.* 2012;16(5):284-7. doi: 10.1089/omi.2011.0118.
12. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303.
13. Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. cytoHubba: Identifying Hub Objects and Sub-Networks from Complex Interactome. *BMC Syst Biol.* 2014;8(Suppl 4):S11. doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
14. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
15. Kim EH, Galchev VI, Kim JY, Misek SA, Stevenson TK, Campbell MD, et al. Differential Protein Expression and Basal Lamina Remodeling in Human Heart Failure. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10(5):585-96. doi: 10.1002/prca.201500099.
16. Gueugneau M, Coudy-Gandillon C, Chambon C, Verney J, Taillandier D, Combaret L, et al. Muscle Proteomic and Transcriptomic Profiling of Healthy Aging and Metabolic Syndrome in Men. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4205. doi: 10.3390/ijms22084205.
17. Chang CF, Yeh YL, Chang HY, Tsai SH, Wang JY. Prevalence and Risk Factors of Sarcopenia among Older Adults Aged  $\geq 65$  Years Admitted to Daycare Centers of Taiwan: Using AWGS 2019 Guidelines. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(16):8299. doi: 10.3390/ijerph18168299.
18. Grant ZL, Coultas L. Growth Factor Signaling Pathways in Vascular Development and Disease. *Growth Factors.* 2019;37(1-2):53-67. doi: 10.1080/08977194.2019.1635591.
19. Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of Insulin Secretion: Role of Mitochondrial Signalling. *Diabetologia.* 2010;53(6):1019-32. doi: 10.1007/s00125-010-1685-0.
20. Krüger M, Kötter S, Grütznert A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, et al. Protein Kinase G Modulates Human Myocardial Passive Stiffness by Phosphorylation of the Titin Springs. *Circ Res.* 2009;104(1):87-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184408.
21. Livshits G, Kalinkovich A. Inflammaging as a Common Ground for the Development and Maintenance of Sarcopenia, Obesity, Cardiomyopathy and Dysbiosis. *Ageing Res Rev.* 2019;56:100980. doi: 10.1016/j.arr.2019.100980.
22. Koshikawa M, Harada M, Noyama S, Kiyono K, Motoike Y, Nomura Y, et al. Association between Inflammation and Skeletal Muscle Proteolysis, Skeletal Mass and Strength in Elderly Heart Failure Patients and their Prognostic Implications. *BMC Cardiovasc Disord.* 2020;20(1):228. doi: 10.1186/s12872-020-01514-0.
23. Tang W, Norlin M, Wikvall K. Glucocorticoid Receptor-Mediated Upregulation of Human CYP27A1, a Potential Anti-Atherogenic Enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781(11-12):718-23. doi: 10.1016/j.bbali.2008.08.005.
24. Gupta RP, Patrick K, Bell NH. Mutational Analysis of CYP27A1: Assessment of 27-Hydroxylation of Cholesterol and 25-Hydroxylation of Vitamin D. *Metabolism.* 2007;56(9):1248-55. doi: 10.1016/j.metabol.2007.04.023.
25. Zhang W, Yi J, Liu D, Wang Y, Jamilian P, Gaman MA, et al. The Effect of Vitamin D on the Lipid Profile as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women: A Meta-Analysis and Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Exp Gerontol.* 2022;161:111709. doi: 10.1016/j.exger.2022.111709.
26. Ter Borg S, Luiking YC, van Helvoort A, Boirie Y, Schols JMGA, de Groot CPGM. Low Levels of Branched Chain Amino Acids, Eicosapentaenoic Acid and Micronutrients are Associated with Low Muscle Mass, Strength and Function in Community-Dwelling Older Adults. *J Nutr Health Aging.* 2019;23(1):27-34. doi: 10.1007/s12603-018-1108-3.
27. Lang V, Youssef N, Light PE. The Molecular Genetics of Sulfonylurea Receptors in the Pathogenesis and Treatment of Insulin Secretory Disorders and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2011;11(6):543-51. doi: 10.1007/s11892-011-0233-8.
28. Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, et al. Role of Genetic Polymorphisms of ion Channels in the Pathophysiology of Coronary Microvascular Dysfunction and Ischemic Heart Disease. *Basic Res Cardiol.* 2013;108(6):387. doi: 10.1007/s00395-013-0387-4.
29. Emanuele E, Falcone C, Carabela M, Minoretto P, D'Angelo A, Montagna L, et al. Absence of Kir6.1/KCNJ8 Mutations in Italian Patients with Abnormal Coronary Vasomotion. *Int J Mol Med.* 2003;12(4):509-12.
30. Yang F, Chen Y, Xue Z, Lv Y, Shen L, Li K, et al. High-Throughput Sequencing and Exploration of the lncRNA-circRNA-miRNA-mRNA Network in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomed Res Int.* 2020;2020:8162524. doi: 10.1155/2020/8162524.
31. Quintanilha JCF, Racioppi A, Wang J, Etheridge AS, Denning S, Peña CE, et al. PIK3R5 Genetic Predictors of Hypertension Induced by VEGF-Pathway Inhibitors. *Pharmacogenomics J.* 2022;22(1):82-8. doi: 10.1038/s41397-021-00261-5.
32. Yano T, Katano S, Kouzu H, Nagaoka R, Inoue T, Takamura Y, et al. Distinct Determinants of Muscle Wasting in Nonobese Heart Failure Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes.* 2021;13(1):7-18. doi: 10.1111/1753-0407.13090.
33. Medvedev NV, Gorshunova NK. Age-Related Sarcopenia as the Risk Factor of Development of Myocardial Dysfunction and Chronic Heart Failure in Elderly Patients with Arterial Hypertension. *Adv Gerontol.* 2012;25(3):456-60.

34. Kim LB, Russkih GS, Putyatina AN, Tsypysheva OB. Age-Related Dynamics of the Contents of Matrix Metalloproteinases (MMP-1, -2, -3, -9) and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMP-1, -2, -4) in Blood Plasma of Residents of the European Part of the Arctic Zone of the Russian Federation. *Adv Gerontol.* 2018;31(2):223-30.
35. Zile MR, O'Meara E, Claggett B, Prescott MF, Solomon SD, Swedberg K, et al. Effects of Sacubitril/Valsartan on Biomarkers of Extracellular Matrix Regulation in Patients with HFrEF. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(7):795-806. doi: 10.1016/j.jacc.2018.11.042.
36. Lluri G, Langlois GD, McClellan B, Soloway PD, Jaworski DM. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2) Regulates Neuromuscular Junction Development Via a Beta1 Integrin-Mediated Mechanism. *J Neurobiol.* 2006;66(12):1365-77. doi: 10.1002/neu.20315.
37. García-Cuesta EM, Santiago CA, Vallejo-Díaz J, Juarranz Y, Rodríguez-Frade JM, Mellado M. The Role of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 Axis in Autoimmune Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:585. doi: 10.3389/fendo.2019.00585.
38. Li R, Frangogiannis NG. Chemokines in Cardiac Fibrosis. *Curr Opin Physiol.* 2021;19:80-91. doi: 10.1016/j.cophys.2020.10.004.
39. Gilbert W, Bragg R, Elmansi AM, McGee-Lawrence ME, Isales CM, Hamrick MW. Stromal Cell-Derived Factor-1 (CXCL12) and its Role in Bone and Muscle Biology. *Cytokine.* 2019;123:154783. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154783.
40. Martínez-Anton A, Gras D, Bourdin A, Dubreuil P, Chanez P. KIT as a Therapeutic Target for Non-Oncological Diseases. *Pharmacol Ther.* 2019;197:11-37. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.12.008.
41. Basuray A, French B, Ky B, Vorovich E, Olt C, Sweitzer NK, et al. Heart Failure with Recovered Ejection Fraction: Clinical Description, Biomarkers, and Outcomes. *Circulation.* 2014;129(23):2380-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006855.
42. Sun S, Shen Y, Wang J, Li J, Cao J, Zhang J. Identification and Validation of Autophagy-Related Genes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2021;16:67-78. doi: 10.2147/COPD.S288428.
43. Del Campo A. Mitophagy as a New Therapeutic Target for Sarcopenia. *Acta Physiol.* 2019;225(2):e13219. doi: 10.1111/apha.13219.
44. Lukacs NW, Strieter RM, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. VCAM-1 Influences Lymphocyte Proliferation and Cytokine Production During Mixed Lymphocyte Responses. *Cell Immunol.* 1994;154(1):88-98. doi: 10.1006/cimm.1994.1059.



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