

Biomarcadores Potenciais na Fibrose Miocárdica: Uma Análise Bioinformática

Potential Biomarkers in Myocardial Fibrosis: A Bioinformatic Analysis

Wang Cheng-Mei,¹ Gang Luo,² Ping Liu,² Wei Ren,² Sijin Yang²

Beibei Traditional Chinese Medicine Hospital,¹ Chongqing - China

The Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Southwest Medical University,² Luzhou, Sichuan - China

Resumo

Fundamento: A fibrose miocárdica (FM) ocorre durante o início e a progressão da doença cardiovascular, e o diagnóstico precoce da FM é benéfico para melhorar a função cardíaca, mas há uma falta de pesquisa sobre biomarcadores precoces da FM.

Objetivos: Utilizando técnicas de bioinformática, identificamos potenciais biomarcadores para FM.

Métodos: Os conjuntos de dados relacionados à FM foram obtidos do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). Após o processamento dos dados, genes diferencialmente expressos foram rastreados. Genes diferencialmente expressos foram enriquecidos e, subsequentemente, interação proteína-proteína (PPI) foi realizado para analisar os genes diferenciais. Os miRNAs associados e fatores de transcrição foram previstos para esses genes centrais. Finalmente, a validação ROC foi realizada nos genes centrais para determinar sua especificidade e sensibilidade como potenciais biomarcadores. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados: Um total de 91 genes diferencialmente expressos foram identificados, e a análise PPI produziu 31 genes centrais. A análise de enriquecimento mostrou que apoptose, colágeno, matriz extracelular, adesão celular e inflamação estavam envolvidos na FM. Cento e quarenta e dois miRNAs potenciais foram identificados. Os fatores de transcrição JUN, NF- κ B1, SP1, RELA, SRF e STAT3 foram enriquecidos na maioria dos alvos principais. Por fim, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1, MYOZ2 e ITGB8 tiveram maior precisão diagnóstica e sensibilidade na predição de FM com base na análise da curva ROC.

Conclusão: Oito genes, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1, MYOZ2 e ITGB8, podem servir como biomarcadores candidatos para FM. Processos como apoptose celular, síntese de proteína de colágeno, formação de matriz extracelular, adesão celular e inflamação estão implicados no desenvolvimento da FM.

Palavras-chave: Fibrose Endomiocárdica; Biomarcadores; MicroRNAs.

Abstract

Background: Myocardial fibrosis (MF) occurs throughout the onset and progression of cardiovascular disease, and early diagnosis of MF is beneficial for improving cardiac function, but there is a lack of research on early biomarkers of MF.

Objectives: Utilizing bioinformatics techniques, we identified potential biomarkers for MF.

Methods: Datasets related to MF were sourced from the GEO database. After processing the data, differentially expressed genes were screened. Differentially expressed genes were enriched, and subsequently, protein-protein interaction (PPI) was performed to analyze the differential genes. The associated miRNAs and transcription factors were predicted for these core genes. Finally, ROC validation was performed on the core genes to determine their specificity and sensitivity as potential biomarkers. The level of significance adopted was 5% ($p < 0.05$).

Results: A total of 91 differentially expressed genes were identified, and PPI analysis yielded 31 central genes. Enrichment analysis showed that apoptosis, collagen, extracellular matrix, cell adhesion, and inflammation were involved in MF. One hundred and forty-two potential miRNAs were identified. The transcription factors JUN, NF- κ B1, SP1, RELA, serum response factor (SRF), and STAT3 were enriched in most of the core targets. Ultimately, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1, MYOZ2, and ITGB8 had higher diagnostic accuracy and sensitivity in predicting MF based on ROC curve analysis.

Conclusion: Eight genes, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1, MYOZ2, and ITGB8, can serve as candidate biomarkers for MF. Processes such as cellular apoptosis, collagen protein synthesis, extracellular matrix formation, cellular adhesion, and inflammation are implicated in the development of MF.

Keywords: Fibrosis Endomiocárdica; Biomarkers; MicroRNAs.

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

Correspondência: Wang Cheng-Mei •

Beibei Traditional Chinese Medicine Hospital - No Chong Qing, 400700 - China

E-mail: wangchengmei157@163.com

Artigo recebido em 03/10/2023, revisado em 17/07/2024, aceito em 26/08/2024

Editor responsável pela revisão: Natália Olivetti

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20230674>

Figura Central: Biomarcadores Potenciais na Fibrose Miocárdica: Uma Análise Bioinformática

**Métodos**

Aquisição de conjuntos de dados de fibrose miocárdica usando o banco de dados GEO



Genes diferencialmente expressos foram enriquecidos



Predição de miRNAs e fatores de transcrição associados a genes centrais



Validação de curvas ROC agudas para genes centrais

Resultados

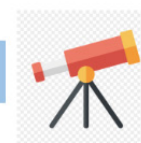
Um total de 91 genes diferenciais foram analisados e 31 genes centrais foram retidos após o processamento



Principalmente enriquecidos em vias intimamente relacionadas à fibrose, como a via de sinalização TGF- β 3, interação ECM-receptor, cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia hipertrófica, apoptose, colágeno, matriz extracelular e adesão celular.



Família miRNA-148a-3p, miRNA-148b-3p e miR-29 previstas, e também fatores de transcrição JUN, NF κ B1, SP1, RELA, SRF e STAT3 identificados



IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACT1, MYOZ2 foram considerados extremamente específicos e sensíveis na análise ROC

Conclusão

Os oito genes, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACT1, MYOZ2 e ITGB8, podem servir como biomarcadores candidatos para fibrose miocárdica. Processos como apoptose celular, síntese de proteína de colágeno, formação de matriz extracelular, adesão celular e inflamação estão implicados no desenvolvimento de fibrose miocárdica.

Arq Bras Cardiol. 2024; 121(12):e20230674

Introdução

As doenças cardiovasculares são comuns e a sua taxa de mortalidade ultrapassa a de outras doenças sistêmicas.¹ Eles ceifam milhões de vidas anualmente, constituindo aproximadamente 25% das mortes em todo o mundo.² A fibrose miocárdica (FM) desempenha um papel fundamental no início e na progressão de condições como fibrilação atrial, doença arterial coronária, infarto do miocárdio, cardiomiopatia dilatada e cardiomiopatia hipertrófica.³⁻⁶ A FM é causada pela deposição anormal de tecidos fibrosos no miocárdio. É caracterizada por um acúmulo excessivo da matriz extracelular (MEC) e um aumento significativo de colágeno, levando à rigidez cardíaca e ao declínio da função cardíaca, seguido por remodelação elétrica, arritmias e insuficiência cardíaca.⁷

Do ponto de vista fisiopatológico, a FM está intrinsecamente ligada aos mecanismos reparadores após dano cardíaco. Cardiomiócitos são células não regenerativas. Quando essas células são danificadas ou morrem, as células circundantes liberam uma série de moléculas de sinalização, como mediadores neuro-humorais, citocinas e fatores de

crescimento, que induzem a ativação dos fibroblastos para entrar na área danificada e produzir grandes quantidades de colágeno.⁸ O colágeno é um componente primário da estrutura do tecido e seu acúmulo excessivo pode levar à deposição anormal da matriz extracelular, reduzindo assim a complacência cardíaca e prejudicando sua função.⁹ À medida que a fibrose progride, as funções sistólica e diastólica do coração ficam ainda mais comprometidas, resultando em insuficiência cardíaca e afetando significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

Muitas doenças cardiovasculares podem se manifestar como FM em estágio inicial.¹⁰ Com o envelhecimento da população global e o aumento de doenças relacionadas ao estilo de vida, como fibrilação atrial, hipertensão, doença cardíaca coronária e diabetes, a incidência de FM está aumentando constantemente, representando uma grave ameaça à saúde humana. Lamentavelmente, os tratamentos atuais se concentram principalmente em retardar a progressão da fibrose, mas não podem revertê-la efetivamente.¹¹ Isso ocorre porque os cardiomiócitos não conseguem substituir adequadamente as células mortas, e o processo de fibrose

envolve células e vias de sinalização extremamente complexas. Portanto, com os avanços tecnológicos em chips de genes, técnicas de sequenciamento e sequenciamento de genoma completo, a identificação precoce da FM e a busca por biomarcadores altamente sensíveis e específicos para elaborar novas estratégias terapêuticas para reverter essa condição se tornam primordiais.

Originário de uma perspectiva de bioinformática, o estudo identificou e analisou genes hub diferencialmente expressos na FM, investigando suas perspectivas como biomarcadores. Os processos centrais deste estudo podem ser visualizados na Figura Central.

Métodos

Obtendo um GeneChip

O *Gene Expression Omnibus*¹² (GEO) foi usado para rastrear três conjuntos de dados de microarray relacionados à FM e seus arquivos de anotação genética, especificamente GSE123018/GPL11154, GSE152250/GPL20301 e GSE225336/GPL24676. Os dados brutos do GSE123018 continham dados de quatro indivíduos; GSE152250 e GSE225336 usaram dados de três indivíduos. Todos os três conjuntos de dados continham cardiomiócitos induzidos por 24 horas usando TGFβ1, então escolhemos o conjunto de dados processado em 24 horas e, para tornar os dados menos diferenciados, selecionamos aleatoriamente os dados celulares dos três pacientes no GSE123018. Todos esses dados são de código aberto e, portanto, não exigem revisão por um comitê de ética.

Triagem de genes expressos diferencialmente

Arquivos relacionados ao chip genético foram obtidos e baixados do banco de dados GEO. Esta pesquisa utilizou conjuntos de dados de três origens distintas, levando a variações no manuseio laboratorial de cada chip genético. Consequentemente, a remoção de efeitos de lote e a normalização de dados se tornaram primordiais.¹³ O pacote *sva* em R (Versão 4.2.1) foi inicialmente aplicado para estimativa de efeito de lote, seguido pelo emprego da função de combate para sua mitigação. Modelos lineares e métodos bayesianos no pacote *limma* foram usados para avaliar os níveis de expressão gênica sob diferentes condições experimentais, corrigir as estimativas de variância de genes individuais e normalizar as matrizes gênicas usando a função *normalize BetweenArrays*, respectivamente. Para selecionar genes com expressão diferencial significativa, definimos um limite de $|\log_2\text{-fold change}|$ valor maior que 2 e valor *p* menor que 0,05 nos critérios de seleção. Técnicas de visualização foram implementadas com os pacotes *ggplot2* e *pheatmap*.

Análise de interações proteína-proteína

A análise da interação proteína-proteína (PPI)¹⁴ oferece insights sobre com quais outras proteínas uma proteína específica interage dentro de um organismo. Isso ajuda a caracterizar melhor as funções dessas proteínas e pode lançar luz sobre o início e a progressão da doença. Genes diferencialmente expressos (GDE) foram inseridos no banco de

dados STRING (<https://stringdb.org/>),¹⁵ que é uma ferramenta de análise online que inclui pontuação de integração de dados, modelagem probabilística, teste hipergeométrico, análise de topologia de rede e correção de taxa de descoberta falsa (TDF), e o arquivo TSV da rede PPI foi exportado. Este arquivo foi posteriormente carregado no Cytoscape (versão 3.8.2)¹⁶ para visualização. O plugin CytoNCA calcula métricas de alvo como grau, proximidade e intermediação, permitindo a seleção de alvos principais. O plugin MCODE é então utilizado para identificar potenciais complexos biomoleculares.

Análise de enriquecimento genético

Utilizando o Metascape (<https://Metascape.org/>),¹⁷ uma plataforma web para análise de enriquecimento funcional de grandes conjuntos de genes, Gene Ontology (GO) e Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) análises de GDE e potenciais complexos biomoleculares foram realizadas usando testes hipergeométricos, método de correção de teste múltiplo do método Benjamini-Hochberg. Entradas com um valor *p* < 0,01 foram consideradas significativamente enriquecidas, e os 15 principais resultados da análise de enriquecimento GO e das vias KEGG foram selecionados.

Análise de enriquecimento do conjunto de genes

Para melhorar de forma abrangente a compreensão das funções dos genes, o software GSEA (versão 4.3.2)¹⁸ foi empregado em todo o conjunto de dados para análise de enriquecimento funcional, abrangendo as vias GO, KEGG e análise Reactome. Para determinar o enriquecimento significativo, os critérios foram estabelecidos da seguinte forma: um escore de enriquecimento normalizado superior a 1,5, um valor de *p* nominal inferior a 0,05 e uma TDF inferior a 0,25.

Aquisição de miRNAs críticos e fatores de transcrição

Os genes Hub foram analisados para potencial miRNA usando o software FunRich (versão 3.1.3),¹⁹ e a predição do fator de transcrição foi realizada usando TRRUST versão 2 (<https://www.grnpedia.org/trrust/>).²⁰

Validação do conjunto de genes com base na curva característica de operação do receptor (ROC)

Para validar a robustez dos genes hub identificados e evitar overfitting dos dados originais, é crucial conduzir a validação ROC²¹ em um conjunto de dados independente para avaliar os genes hub como potenciais biomarcadores. Utilizamos o conjunto de dados de microarray de genes GSE97358, que inclui 84 amostras normais e 84 amostras fibróticas. A análise e visualização ROC foram conduzidas no software R usando o pacote *pROC*.

Resultados

Análise de GDEs

Após o conjunto de dados original ter sido corrigido em lote e normalizado, uma análise diferencial foi conduzida usando o pacote *limma*. Por fim, 91 GDE foram identificados,

com 56 genes significativamente regulados positivamente e 35 genes significativamente regulados negativamente. Mapas de calor de genes e gráficos de vulcão de GDE são ilustrados na Figura 1. Os parâmetros topológicos específicos dos GDE podem ser encontrados na Tabela S1.

Análise PPI

Os 91 GDE foram carregados no site STRING para análise PPI. Os resultados da análise foram importados para o Cytoscape para investigação posterior. A Figura 2A descreve a rede consistindo em 37 nós e 71 arestas. Os graus de gene foram calculados usando CytoNCA e, ao classificar valores maiores que a mediana, 28 genes hub foram identificados. Os parâmetros topológicos específicos dos genes hub podem ser encontrados na Tabela S2. Enquanto isso, o plugin MCODE revelou um potencial módulo funcional de complexo de proteína (Figura 2B).

Enriquecimento funcional

A análise da expressão gênica diferencial destacou que, como mostrado na Figura 3A, os genes participam de processos biológicos como migração mesenquimal, desenvolvimento do tecido conjuntivo, desenvolvimento do tecido miocárdico, resposta a estímulos mecânicos, processo do sistema circulatório e desenvolvimento do tecido muscular estriado. A Figura 3B demonstra o envolvimento em várias funções biológicas moleculares, como ligação da molécula de adesão celular, ligação da integrina, atividade do

fator de crescimento, ligação do glicosaminoglicano, ligação do colágeno, constituintes estruturais da matriz extracelular e atividade da oxidoredutase. Os componentes celulares implicados incluem a MEC, estruturas encapsulantes externas, MEC contendo colágeno, lúmen do grânulo secretor, lúmen da vesícula citoplasmática e miofibrilas, como mostrado na Figura 3C. A análise da via KEGG indicou envolvimento em múltiplas vias de sinalização, como a via de sinalização do hipotálamo, interação citocina-receptor de citocina, cardiomiopatia hipertrófica, interação MEC-receptor, cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito, senescência celular, fator de crescimento transformador- β (TGF- β) via de sinalização, Cardiomiopatia dilatada e via de sinalização p53, que podem ser observadas na Figura 3D. Todas as análises de enriquecimento com valores de p menores que 0,05 são mostradas na Tabela S3. A análise de enriquecimento do módulo biológico mostrou envolvimento na montagem da MEC e na migração mesenquimal, conforme mostrado na Figura 4.

Resultados GSEA

Ao conduzir GSEA no conjunto de dados de genes totalmente ajustado, o Reactome revelou enriquecimentos primários em TGF- β , sinalização do fator de necrose tumoral Hallmark- α (TNF- α) via NF- κ B, sinalização mTorc1, sinalização Hedgehog e resposta de proteína desdobrada. Os principais componentes celulares incluíram o processoma da subunidade, pré-ribossomo e trimeros

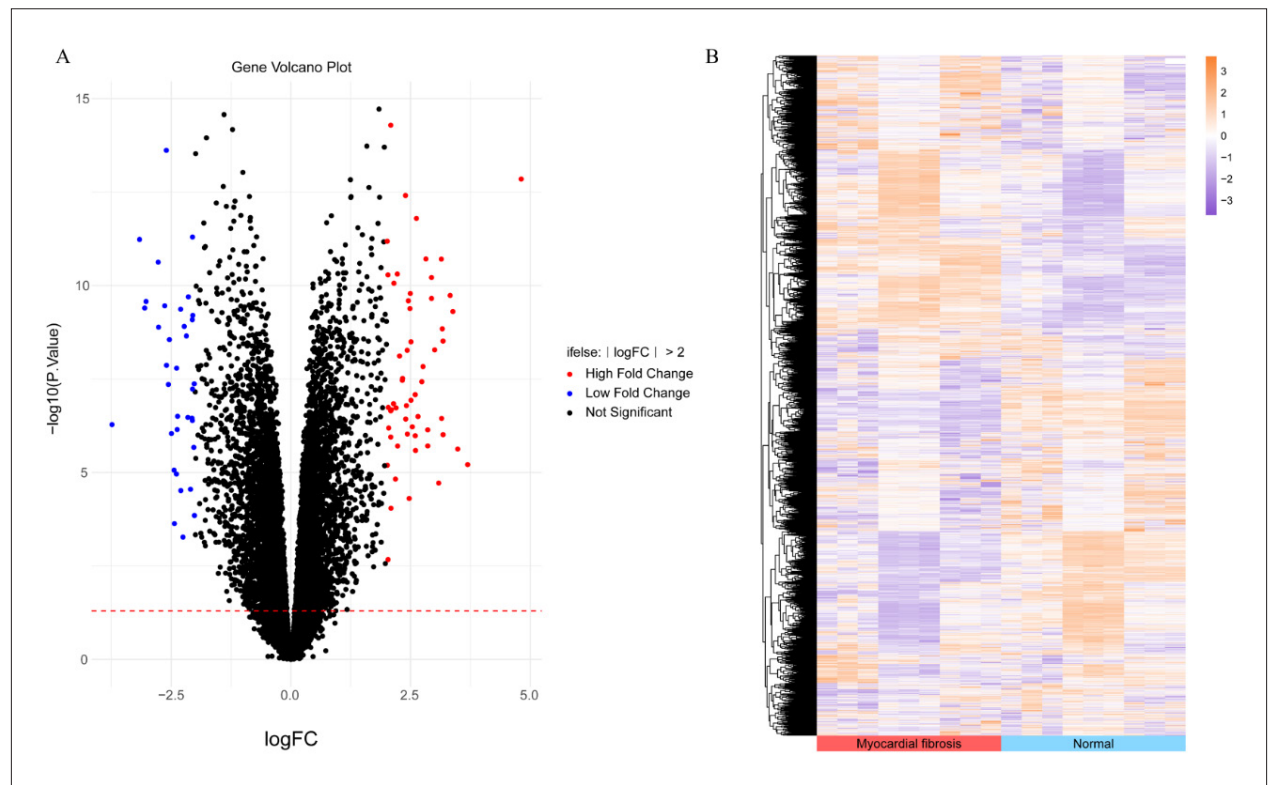


Figura 1 – A) Gráfico do vulcão genético. B) Mapa de calor genético.

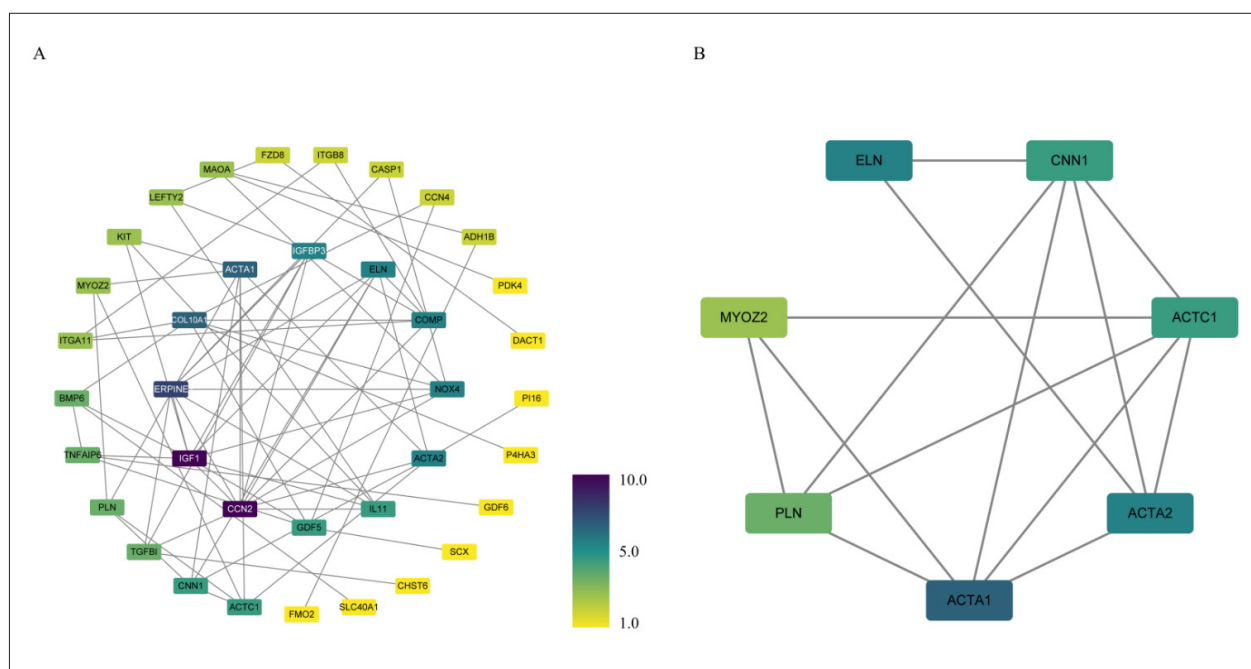


Figura 2 – A) Rede PPI. B) módulos biofuncionais.

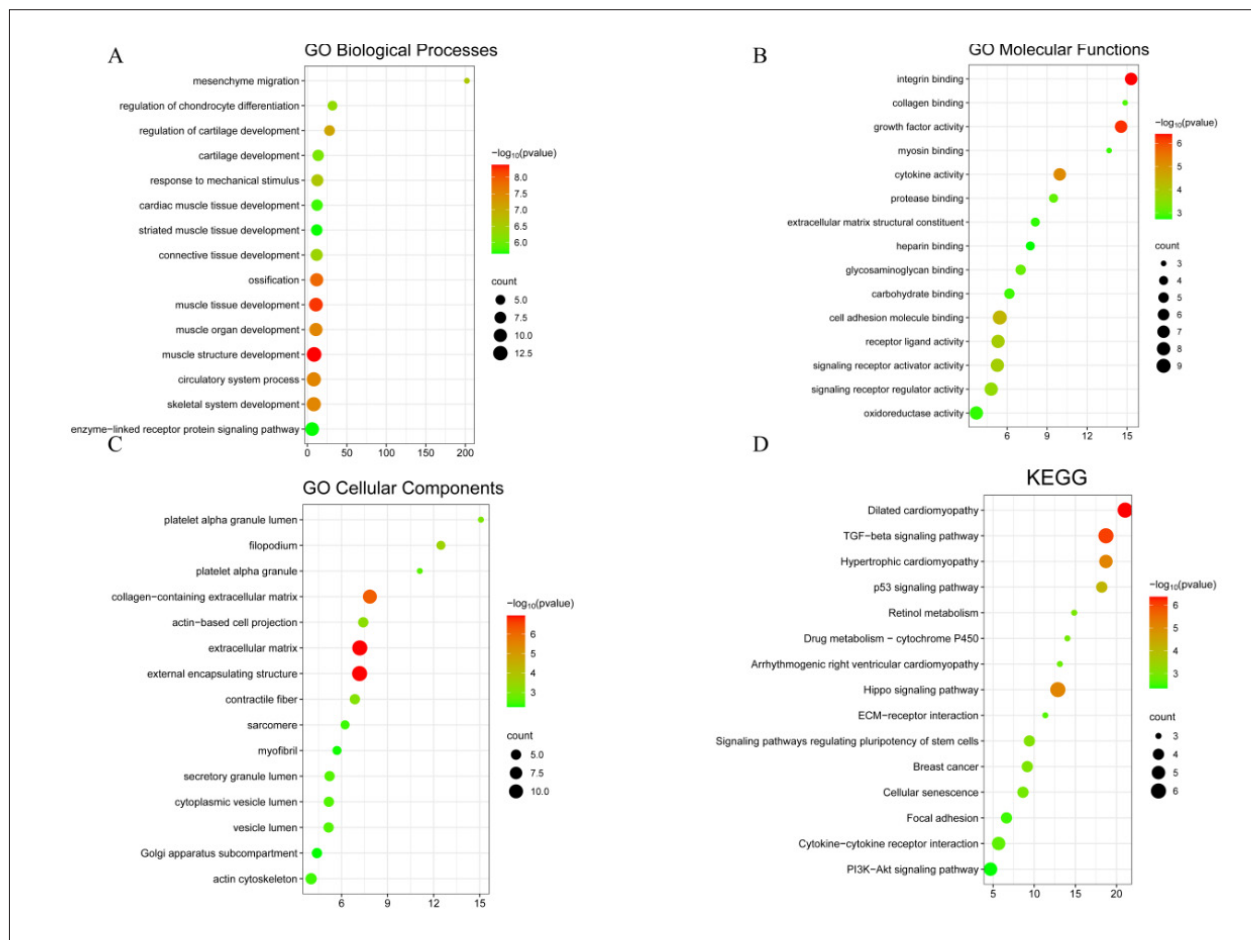


Figura 3 – A) Processos biológicos do GO. B) Função molecular do GO. C) Componentes celulares do GO. D) KEGG.

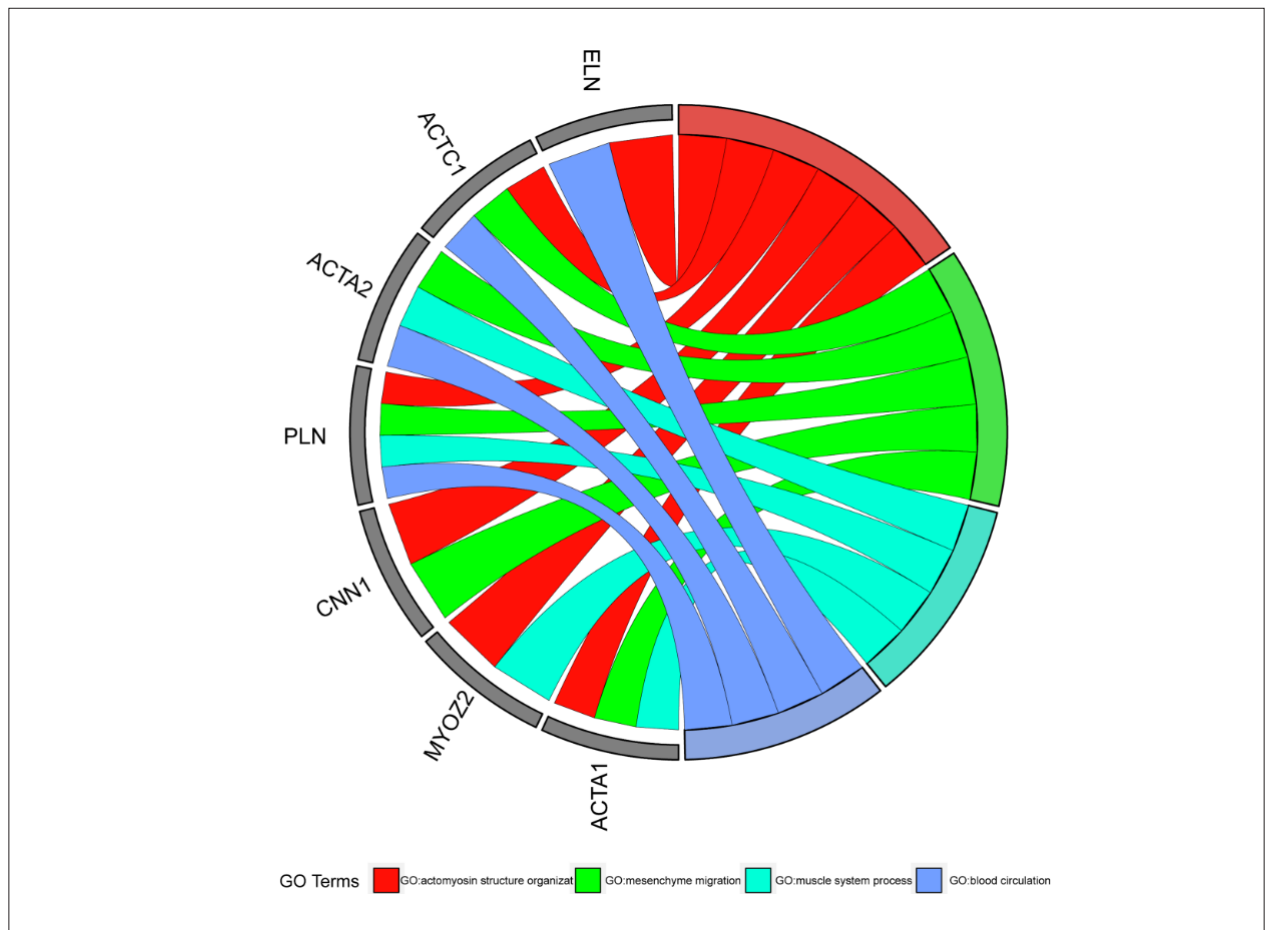


Figura 4 – Análise de enriquecimento do módulo biológico.

complexos de colágeno. Em termos de funções biológicas, a participação do gene foi observada na atividade do inibidor do regulador de transcrição, constituinte estrutural da MEC e atividade do fator de crescimento. A análise da via KEGG mostrou envolvimento na via de sinalização TGF- β , biossíntese de glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina e cardiomiopatia dilatada. Lamentavelmente, nos processos biológicos GO, nenhum conjunto de genes foi significativo em uma TDF abaixo de 25%, conforme ilustrado na Figura 5, e os parâmetros relevantes podem ser encontrados na Tabela S4.

Predição de miRNAs e fatores de transcrição

Utilizando FunRich para prever miRNAs, a análise de abundância reteve miRNA-148a-3p, miRNA-148b-3p, miR-152-3p, miR-372-3p, miR-506-3p, a família miR-130, a família miR-302, a família miR-29 e a família miR-520, conforme exibido na Figura 6. A previsão pós-análise de fatores de transcrição por meio da plataforma TRRUST revelou que o proto-oncogene Jun (JUN), NF- κ B1, fator de transcrição Sp1(SP1), proto-oncogene RELA (RELA), fator de resposta sérica (SRF), e transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) foram altamente enriquecidos entre a maioria dos alvos principais, conforme ilustrado na Figura 7.

Os resultados da validação do ROC

Durante a análise ROC dos principais alvos, o estudo descobriu que as AUCs para os genes interleucina 11 (IL11), beta induzível por parada do crescimento e dano ao DNA (GADD45B), fator de diferenciação do crescimento 5 (GDF5), NADPH oxidase 4 (NOX4), proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina 3 (IGFBP3), actina alfa do músculo cardíaco 1 (ACTC1), miozenina 2 (MYOZ2) e subunidade beta 8 da integrina (ITGB8) foram 0,964710884, 0,943239796, 0,936791383, 0,929563492, 0,92651644, 0,926232993, 0,91723356 e 0,906391723, respectivamente. Todas as AUCs foram maiores que 0,9; entre elas, IL11, GADD45B, NOX4, IGFBP3 e ACTC1 são reguladas positivamente na fibrose, enquanto GDF5, MYOZ2 e ITGB8 são reguladas negativamente na expressão, comprovando esses genes como potenciais marcadores biológicos para o diagnóstico de FM.

Discussão

As doenças cardiovasculares, como principal causa de morte em todo o mundo, representam um fardo significativo para a saúde pública global.¹ Condições cardiovasculares comuns, como doença cardíaca coronária, infarto do miocárdio,

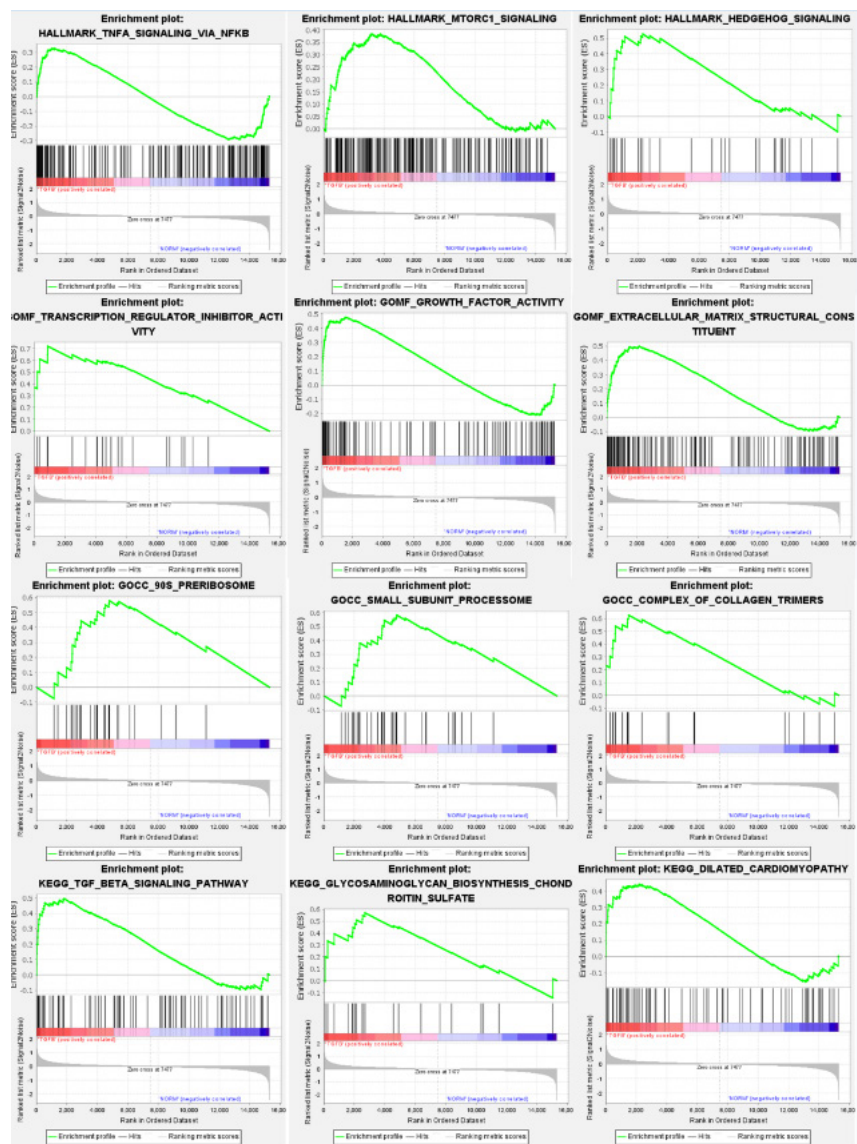
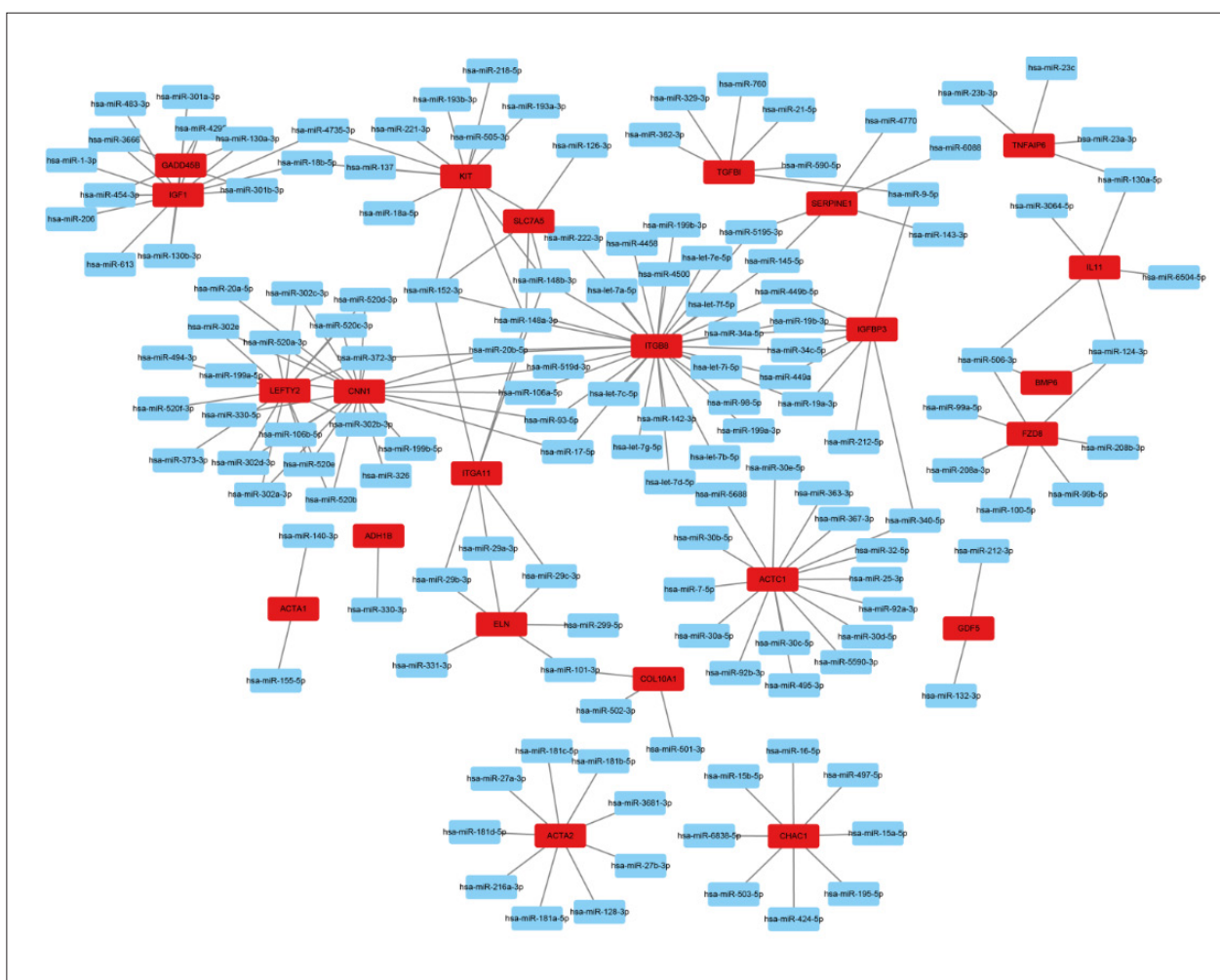


Figura 5 – GSEA.

doença cardíaca hipertensiva, cardiomiopatia, fibrilação atrial e cardiomiopatia diabética, podem levar à FM, resultando em insuficiência cardíaca. A FM induzida por doenças cardiovasculares é principalmente reparadora, manifestando-se como a transformação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos sob estímulos patológicos quando as células cardíacas são lesionadas. Esses miofibroblastos podem secretar uma grande quantidade de MEC, promovendo a formação de tecido cicatricial, aumentando assim a rigidez cardíaca, levando à FM e resultando em remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca. Em contraste, o processo de remodelação da MEC requer a deposição de grandes quantidades de colágeno e outras proteínas; o tipo de colágeno e a reticulação de outras proteínas também estão inextricavelmente ligadas à remodelação.²² Existem colágenos tipo I e tipo III na MEC.

O colágeno tipo I compõe 85% do colágeno total e está principalmente associado às fibras grossas que fornecem resistência à tração, alongamento e deformabilidade. Em contraste, o colágeno tipo III compõe 11% do colágeno total e está associado às fibras finas que fornecem elasticidade, e a deposição de colágeno de ambos os tipos pode diminuir a complacência miocárdica.²³ Atualmente, o tratamento clínico da FM emprega principalmente intervenções farmacológicas visando o sistema renina-angiotensina-aldosterona para desacelerar a progressão da fibrose; no entanto, os resultados têm sido subótimos.²⁴ O transplante cardíaco pode prolongar a sobrevivência do paciente, mas traz consigo seu próprio conjunto de desafios, como riscos elevados, complicações múltiplas e suscetibilidade à rejeição do enxerto, que afetam negativamente os resultados do



Por meio da análise de enriquecimento GO e KEGG, os genes-chave foram enriquecidos principalmente em vias intimamente relacionadas à fibrose, como a via de sinalização TGF- β , interação MEC-receptor, cardiomiopatia dilatada e cardiomiopatia hipertrófica. Além disso, esses genes estão envolvidos em processos biológicos, como a interação citocina-receptor citocina, a via de sinalização p53, a via de sinalização Hippo e migração mesenquimal,

Estudos demonstraram que a inibição dessas vias pode suprimir a apoptose dos cardiomiócitos e reduzir a formação de FM.^{35,36} Além disso, a pesquisa indica que o SO₂ pode inibir a via Hippo-MST, aliviando a apoptose celular e o estresse do retículo endoplasmático, atenuando significativamente a FM em ratos diabéticos.³⁷ Da mesma forma, a análise de enriquecimento do módulo central revelou que suas funções

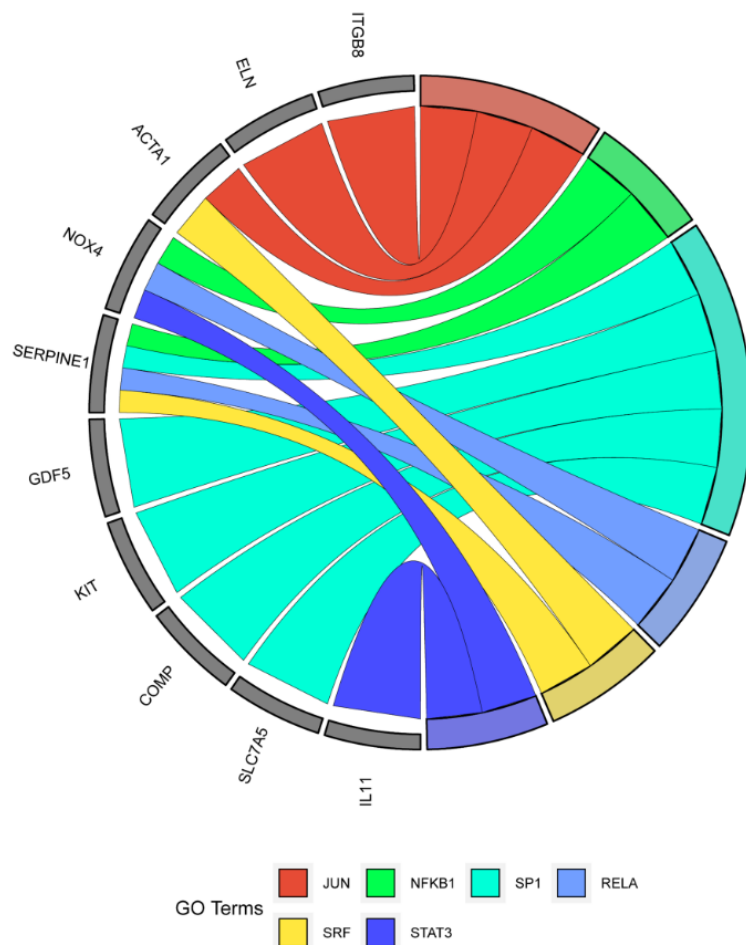


Figura 7 – Análise dos fatores de transcrição.

estão intimamente relacionadas aos principais mecanismos da FM, como a montagem da MEC e a migração mesenquimal. Como um suplemento à análise de enriquecimento do gene central, a GSEA continua a destacar a deposição da MEC como um processo central na FM. Além disso, ela introduz as vias inflamatórias de sinalização Hedgehog, mTORC1 e TNF- α por meio do NF- κ B, que foram todas confirmadas como relacionadas à FM em vários estudos globais.³⁸⁻⁴⁰

A expressão gênica em organismos biológicos depende da regulação de miRNAs. Após prever miRNAs para genes hub, foi descoberto que miRNA-148a-3p, miRNA-148b-3p, miR-152-3p, miR-372-3p, miR-506-3p, a família miR-130, a família miR-302, a família miR-29 e a família miR-520 são compartilhadas pela maioria dos genes. A família miR-29, em particular, é uma das famílias de miRNA mais amplamente estudadas na FM. Numerosos estudos mostraram que a família miR-29 pode atingir uma variedade de genes relacionados à síntese de MEC, como várias proteínas de colágeno. Sua regulação negativa na fibrose pode levar à deposição excessiva de componentes da MEC.^{41,42} Em um experimento animal, Sheng-song Xu et al. descobriram que a expressão de miR-

152-3p reduzia a proliferação de fibroblastos cardíacos (FC) e aliviava a FM ao inibir a via de sinalização Wnt1/ β -catenina.⁴³

Da mesma forma, a regulação negativa do miR-130 promove efeitos cardioprotetores mediados pelo PPAR- γ por meio da inibição da inflamação e da FM.⁴⁴ Portanto, a família hsa-miR-29, miR-152-3p e miR-130 poderiam potencialmente servir como marcadores biológicos e alvos terapêuticos para FM. A análise de fatores de transcrição indicou que JUN, NF- κ B1, SP1, RELA, SRF e STAT3 estão envolvidos em vias relacionadas à inflamação, proliferação celular, apoptose e respostas ao estresse celular. NF- κ B1 e RELA são parte do complexo NF- κ B.⁴⁵ Geng-Rui Xu descobriu que, ao inibir a via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B, a deposição de colágeno foi significativamente reduzida, melhorando assim a FM.⁴⁶ STAT3 está intimamente relacionado à FM e está envolvido em múltiplas vias de sinalização. Estudos demonstraram que a inibição das vias IL-6/STAT3 e JAK-STAT3 alivia o grau de FM.^{47,48}

Após realizar análise de especificidade e sensibilidade usando ROC, identificamos genes com AUC maior que 0,9, incluindo IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1,

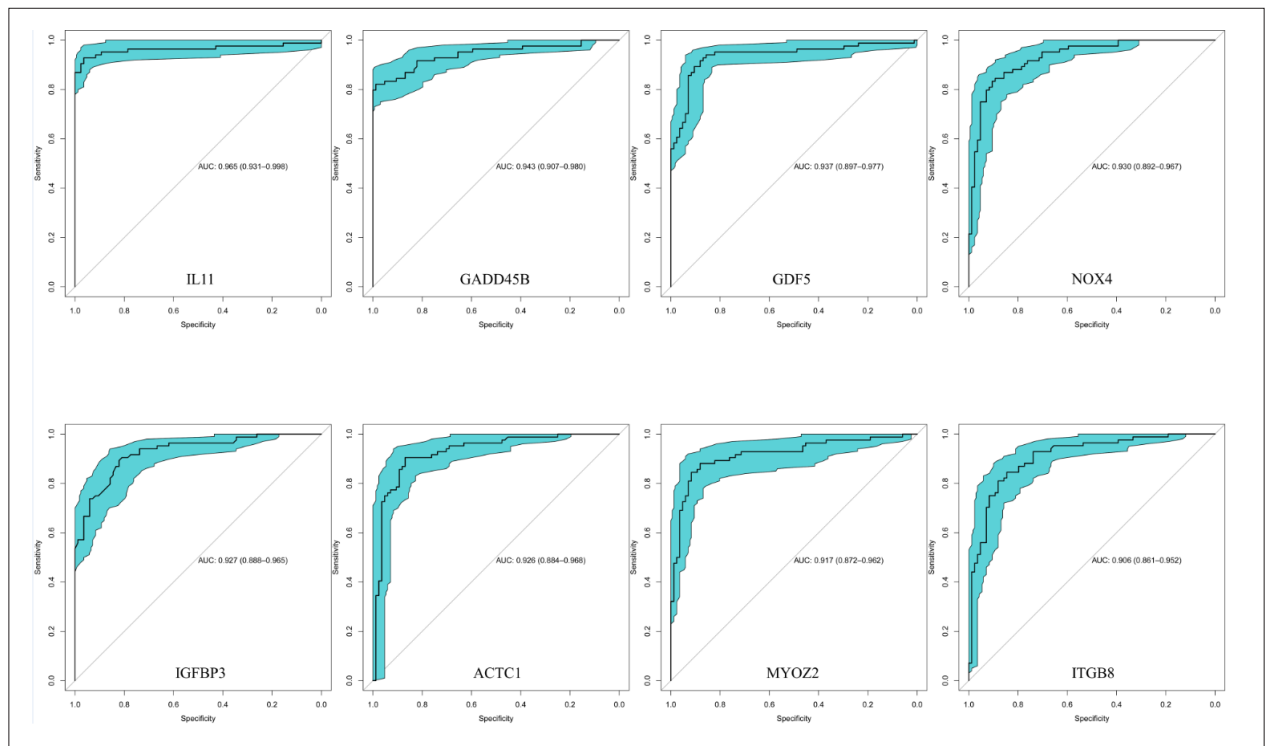


Figura 8 – ROCs de genes centrais.

MYOZ2 e ITGB8. IL11 é um gene profibrótico clássico. Experimentos recentes mostraram que a secreção de IL11 pode promover sinalização parácrina em fibroblastos adjacentes, bem como transição epitelial-mesenquimal e transição endotelial-mesenquimal, exibindo efeitos profibróticos e pró-inflamatórios evidentes.^{49,50} Em outro estudo, foi descoberto que a IL-11 pode sinergizar ou aumentar os efeitos fibróticos do TGF- β .⁵¹ Tongtong Song et al. descobriram em experimentos celulares que a inibição de IL11 em células reduziu significativamente a expressão de mRNA e proteína do colágeno tipo I e colágeno tipo III, melhorando assim a remodelação da MEC.⁵² GADD45B é um gene que é regulado positivamente em danos ao DNA e respostas ao estresse, desempenhando papéis em vários processos biológicos, particularmente na regulação do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e respostas ao estresse celular.⁵³ A pesquisa mostrou que a driamicina aumentou significativamente o colágeno tipo I, e o colágeno tipo III, diminuiu a função cardíaca, e induziu FM na MEC pela regulação positiva de GADD45B e a ativação de p38 e pJNK no coração.⁵⁴ GDF5 pode regular a expressão de p38-MAPK, subsequentemente inibindo a transcrição de colágeno tipo I e Col1a1 e colágeno tipo III, bem como genes Col3a1 em células cardíacas. Isso leva a uma redução na FM após infarto do miocárdio.⁵⁵ NOX4 é um membro da família NADPH oxidase que medeia a produção de ROS. Numerosos estudos demonstraram que a inibição do estresse oxidativo induzido por NOX4 pode ter efeitos antifibróticos no miocárdio.⁵⁶ Além disso, o NOX4 é regulado pelo TGF- β , uma via fundamental na FM.⁵⁷ Além disso, em um experimento in vivo e in vitro, Nox4 foi encontrado mediando

no meio da via TGF β 1 para promover a síntese de colágeno, mas, infelizmente, o experimento não elucidou qual colágeno especificamente.⁵⁸ Da mesma forma, experimentos recentes mostraram que IGFBP3 é altamente expresso em fibroblastos em modelos murinos de FM.⁵⁹ Li et al. descobriram que a inibição da expressão de IGFBP3 atenuou a expressão de colágeno I e III na FM induzida por diabetes.⁶⁰ Um estudo de Alessandra Ruggiero descobriu que camundongos mutantes MYOZ2 podem desenvolver hipertrofia de células cardíacas e fibrose intersticial.⁶¹ ACTC1 é uma proteína-chave nos miócitos cardíacos e está envolvida em sua função contrátil. Embora mutações em ACTC1 sejam conhecidas por estarem associadas a certas doenças cardíacas, como a cardiomiopatia hipertrófica familiar (HCM),⁶² atualmente não há evidências definitivas que liguem ACTC1 diretamente à FM. Mais pesquisas são necessárias para elucidar essa relação. ITGB8 é um membro da família integrina e está envolvido em interações entre células, bem como entre células e a MEC.⁶³ Estudo indica que ITGB8 participa principalmente do processo de fibrose pulmonar, mas seu papel na FM ainda não foi totalmente estabelecido.⁶⁴ No entanto, outros membros da família das integrinas, como o ITGB1, são conhecidos por estarem associados à FM,⁶⁵ garantindo uma investigação mais aprofundada sobre as funções do ITGB8.

Este estudo tem certas limitações, pois os resultados que obtivemos foram derivados de conjuntos de dados do banco de dados GEO. Embora esforços tenham sido feitos para controlar e normalizar os efeitos em três conjuntos de dados experimentais, as descobertas não foram verificadas em experimentos do mundo real. Além disso, ao adquirir os

conjuntos de dados originais, por uma questão de consistência entre os três conjuntos de dados, optamos pelo grupo experimental induzido por TGF- β de 24 horas sem selecionar os grupos experimentais de 48 ou 72 horas. Embora uma literatura substancial sugira que fibrose significativa pode ser observada após 24 horas de indução, essa abordagem pode ter perdido informações cruciais no processo dinâmico. Além disso, o biomarcador central da FM, TGF- β , não exibiu altos níveis de confiança no conjunto de dados GSE97358, apesar de sua AUC ser 0,882015306. Isso requer uma experimentação extensiva para verificar a especificidade e a sensibilidade desses biomarcadores potenciais.

Conclusão

Os oito genes, IL11, GADD45B, GDF5, NOX4, IGFBP3, ACTC1, MYOZ2 e ITGB8, podem servir como biomarcadores candidatos para FM. Processos como apoptose celular, síntese de proteína de colágeno, formação de MEC, adesão celular e inflamação estão implicados no desenvolvimento da FM.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de dados, Análise e interpretação dos dados e Redação do manuscrito: Cheng-Mei W, Luo G, Liu P, Ren W, Yang S; Análise

estatística: Cheng-Mei W, Liu P, Ren W, Yang S; Obtenção de financiamento: Cheng-Mei W, Ren W, Yang S; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo: Cheng-Mei W, Luo G, Ren W, Yang S.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Innovation Team and Talents Cultivation Program of National Administration of Traditional Chinese Medicine (Number: ZYCYXTD-C-202207), Innovation Team of Sichuan Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Number: 2022C007), and Sichuan Science and Technology Program (No. 2022YF50618).

Vinculação acadêmica

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

Aprovação ética e consentimento informado

Este artigo não contém estudos com humanos ou animais realizados por nenhum dos autores.

Referências

- Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
- Araújo F, Gouvêas C, Fontes F, La Vecchia C, Azevedo A, Lunet N. Trends in Cardiovascular Diseases and Cancer Mortality in 45 Countries from Five Continents (1980-2010). *Eur J Prev Cardiol*. 2014;21(8):1004-17. doi: 10.1177/2047487313497864.
- Hao H, Yan S, Zhao X, Han X, Fang N, Zhang Y, et al. Atrial Myocyte-derived Exosomal microRNA Contributes to Atrial Fibrillation in Atrial Fibrillation. *J Transl Med*. 2022;20(1):407. doi: 10.1186/s12967-022-03617-y.
- Zegard A, Okafor O, Bono J, Kalla M, Lencioni M, Marshall H, et al. Myocardial Fibrosis as a Predictor of Sudden Death in Patients with Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(1):29-41. doi: 10.1016/j.jacc.2020.10.046.
- Prasad SK, Halliday BP. Myocardial Fibrosis in Dilated Cardiomyopathy: Moving from Stratifying Risk to Improving Outcomes. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021;14(7):1351-3. doi: 10.1016/j.jcmg.2021.03.015.
- Habib M, Adler A, Fardini K, Hoss S, Hanneman K, Rowin EJ, et al. Progression of Myocardial Fibrosis in Hypertrophic Cardiomyopathy: A Cardiac Magnetic Resonance Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2021;14(5):947-58. doi: 10.1016/j.jcmg.2020.09.037.
- Ma ZC, Yuan YP, Wu HM, Zhang X, Tang QZ. Cardiac Fibrosis: New Insights Into the Pathogenesis. *Int J Biol Sci*. 2018;14(12):1645-57. doi: 10.7150/ijbs.28103.
- González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71(15):1696-706. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.021.
- Zuo S, Wang B, Liu J, Kong D, Cui H, Jia Y, et al. ER-anchored CRTH2 Antagonizes Collagen Biosynthesis and Organ Fibrosis Via Binding LARP6. *EMBO J*. 2021;40(16):e107403. doi: 10.15252/embj.2020107403.
- Morrow DA, O'Donoghue ML. Galectin-3 in Cardiovascular Disease: A Possible Window Into Early Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(14):1257-8. doi: 10.1016/j.jacc.2012.05.032.
- Li X, Yang Y, Chen S, Zhou J, Li J, Cheng Y. Epigenetics-based Therapeutics for Myocardial Fibrosis. *Life Sci*. 2021;271:119186. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119186.
- Clough E, Barrett T. The Gene Expression Omnibus Database. *Methods Mol Biol*. 2016;1418:93-110. doi: 10.1007/978-1-4939-3578-9_5.
- Weishaupt H, Johansson P, Sundström A, Lubovac-Pilav Z, Olsson B, Nelander S, et al. Batch-normalization of Cerebellar and Medulloblastoma Gene Expression Datasets Utilizing Empirically Defined Negative Control Genes. *Bioinformatics*. 2019;35(18):3357-64. doi: 10.1093/bioinformatics/btz066.
- Lin JS, Lai EM. Protein-protein Interactions: Co-immunoprecipitation. *Methods Mol Biol*. 2017;1615:211-9. doi: 10.1007/978-1-4939-7033-9_17.
- Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, Lyon D, Kirsch R, Pyysalo S, et al. The STRING Database in 2021: Customizable Protein-protein Networks, and Functional Characterization of User-uploaded Gene/measurement Sets. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):605-12. doi: 10.1093/nar/gkaa1074.
- 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.
- Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape Provides a Biologist-oriented Resource for the Analysis of Systems-level Datasets. *Nat Commun*. 2019;10(1):1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
- 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 U S A*. 2005;102(43):15545-50. doi: 10.1073/pnas.0506580102.

19. Benito-Martin A, Peinado H. FunRich Proteomics Software Analysis, Let the Fun Begin! *Proteomics*. 2015;15(15):2555-6. doi: 10.1002/pmic.201500260.
20. Han H, Cho JW, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, et al. TRRUST v2: An Expanded Reference Database of Human and Mouse Transcriptional Regulatory Interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):380-6. doi: 10.1093/nar/gkx1013.
21. Mandrekar JN. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. *J Thorac Oncol*. 2010;5(9):1315-6. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d.
22. González A, López B, Ravassa S, San José G, Díez J. Reprint of "The Complex Dynamics of Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure. Focus on Collagen Cross-linking". *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(3):118521. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.07.016.
23. Weber KT, Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Carroll EP. Patterns of Myocardial Fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1989;21(Suppl 5):121-31. doi: 10.1016/0022-2828(89)90778-5.
24. AlQudah M, Hale TM, Czubryt MP. Targeting the Renin-angiotensin-aldosterone System in Fibrosis. *Matrix Biol*. 2020;91-92:92-108. doi: 10.1016/j.matbio.2020.04.005.
25. Potena L, Zuckermann A, Barberini F, Aliabadi-Zuckermann A. Complications of Cardiac Transplantation. *Curr Cardiol Rep*. 2018;20(9):73. doi: 10.1007/s11886-018-1018-3.
26. Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, Correll RN, Fu X, Schips T, et al. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 Signaling Underlies Cardiac Fibrosis. *J Clin Invest*. 2017;127(10):3770-83. doi: 10.1172/JCI94753.
27. Lin P, Tong X, Xue F, Qianru C, Xinyu T, Zhe L, et al. Polystyrene Nanoplastics Exacerbate Lipopolysaccharide-induced Myocardial Fibrosis and Autophagy in Mice Via ROS/TGF- β 1/Smad. *Toxicology*. 2022;480:153338. doi: 10.1016/j.tox.2022.153338.
28. Tu JH, Xu Y, Dai Y, Dang L. Effect of Alprostadil on Myocardial Fibrosis in Rats with Diabetes Mellitus Via TGF- β 1/Smad Signaling Pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(21):9633-41. doi: 10.26355/eurev_201911_19457.
29. Xiao H, Li B, Yang X, Yin Q. Interference of TGF- β 1/Smad7 Signal Pathway Affects Myocardial Fibrosis in Hypertension. *Pak J Pharm Sci*. 2020;33(6):2625-31.
30. Lauer D, Slavic S, Sommerfeld M, Thöne-Reineke C, Sharkovska Y, Hallberg A, et al. Angiotensin Type 2 Receptor Stimulation Ameliorates Left Ventricular Fibrosis and Dysfunction Via Regulation of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1/matrix Metalloproteinase 9 Axis and Transforming Growth Factor β 1 in the Rat Heart. *Hypertension*. 2014;63(3):e60-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02522.
31. Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, et al. Regulation of Matrix Metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in Cardiac Fibroblasts by TGF- β 1 Involves Furin-convertase. *Cardiovasc Res*. 2004;63(1):87-97. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.010.
32. Chen G, Xu H, Xu T, Ding W, Zhang G, Hua Y, et al. Calycosin Reduces Myocardial Fibrosis and Improves Cardiac Function in Post-myocardial Infarction Mice by Suppressing TGF β 1 Signaling Pathways. *Phytomedicine*. 2022;104:154277. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154277.
33. Tan Z, Jiang X, Zhou W, Deng B, Cai M, Deng S, et al. Taohong Siwu Decoction Attenuates Myocardial Fibrosis by Inhibiting Fibrosis Proliferation and Collagen Deposition Via TGF β 1 Signaling Pathway. *J Ethnopharmacol*. 2021;270:113838. doi: 10.1016/j.jep.2021.113838.
34. Tian J, Zhang M, Suo M, Liu D, Wang X, Liu M, et al. Dapagliflozin Alleviates Cardiac Fibrosis Through Suppressing EndMT and Fibroblast Activation Via AMPK α /TGF- β /Smad Signalling in Type 2 Diabetic Rats. *J Cell Mol Med*. 2021;25(16):7642-59. doi: 10.1111/jcmm.16601.
35. Xu Z, Lu D, Yuan J, Wang L, Wang J, Lei Z, et al. Storax Attenuates Cardiac Fibrosis following Acute Myocardial Infarction in Rats Via Suppression of AT1R-Ankrd1-P53 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13161. doi: 10.3390/ijms232113161.
36. Tsai CR, Martin JF. Hippo Signaling in Cardiac Fibroblasts During Development, Tissue Repair, and Fibrosis. *Curr Top Dev Biol*. 2022;149:91-121. doi: 10.1016/bs.ctdb.2022.02.010.
37. Liu M, Liu S, Tan W, Tang F, Long J, Li Z, et al. Gaseous Signalling Molecule SO₂ Via Hippo-MST Pathway to Improve Myocardial Fibrosis of Diabetic Rats. *Mol Med Rep*. 2017;16(6):8953-63. doi: 10.3892/mmr.2017.7714.
38. Li L, Gan H. Intact Fibroblast Growth Factor 23 Regulates Chronic Kidney Disease-induced Myocardial Fibrosis by Activating the Sonic Hedgehog Signaling Pathway. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(18):e026365. doi: 10.1161/JAHA.122.026365.
39. Ye T, Yan Z, Chen C, Wang D, Wang A, Li T, et al. Lactoferrin Attenuates Cardiac Fibrosis and Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction Via Inhibiting mTORC1/S6K Signaling Pathway. *Theranostics*. 2023;13(10):3419-33. doi: 10.7150/thno.85361.
40. Liu J, Lu J, Zhang L, Liu Y, Zhang Y, Gao Y, et al. The Combination of Exercise and Metformin Inhibits TGF- β 1/Smad Pathway to Attenuate Myocardial Fibrosis in db/db Mice by Reducing NF- κ B-mediated Inflammatory Response. *Biomed Pharmacother*. 2023;157:114080. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114080.
41. Li C, Wang N, Rao P, Wang L, Lu D, Sun L. Role of the microRNA-29 Family in Myocardial Fibrosis. *J Physiol Biochem*. 2021;77(3):365-76. doi: 10.1007/s13105-021-00814-z.
42. Liu MN, Luo G, Gao WJ, Yang SJ, Zhou H. miR-29 family: A Potential Therapeutic Target for Cardiovascular Disease. *Pharmacol Res*. 2021;166:105510. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105510.
43. Xu SS, Ding JF, Shi P, Shi KH, Tao H. DNMT1-Induced miR-152-3p Suppression Facilitates Cardiac Fibroblast Activation in Cardiac Fibrosis. *Cardiovasc Toxicol*. 2021;21(12):984-99. doi: 10.1007/s12012-021-09690-x.
44. Chu X, Wang Y, Pang L, Huang J, Sun X, Chen X. miR-130 Aggravates Acute Myocardial Infarction-induced Myocardial Injury by Targeting PPAR- γ . *J Cell Biochem*. 2018;119(9):7235-44. doi: 10.1002/jcb.26903.
45. Huang T, Kang W, Zhang B, Wu F, Dong Y, Tong JH, et al. miR-508-3p Concordantly Silences NF κ B1 and RELA to Inactivate Canonical NF- κ B Signaling in Gastric Carcinogenesis. *Mol Cancer*. 2016;15:9. doi: 10.1186/s12943-016-0493-7.
46. Xu GR, Zhang C, Yang HX, Sun JH, Zhang Y, Yao TT, et al. Modified Citrus Pectin Ameliorates Myocardial Fibrosis and Inflammation Via Suppressing Galectin-3 and TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway. *Biomed Pharmacother*. 2020;126:110071. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110071.
47. Fang T, Guo B, Xue L, Wang L. Atorvastatin Prevents Myocardial Fibrosis in Spontaneous Hypertension Via Interleukin-6 (IL-6)/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)/Endothelin-1 (ET-1) Pathway. *Med Sci Monit*. 2019;25:318-23. doi: 10.12659/MSM.912032.
48. Singh R, Kaundal RK, Zhao B, Bouchareb R, Lebeche D. Resistin Induces Cardiac Fibroblast-myofibroblast Differentiation Through JAK/STAT3 and JNK/c-Jun Signaling. *Pharmacol Res*. 2021;167:105414. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105414.
49. Sweeney M, O'Fee K, Villanueva-Hayes C, Rahman E, Lee M, Vanezis K, et al. Cardiomyocyte-restricted Expression of IL11 Causes Cardiac Fibrosis, Inflammation, and Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16):12989. doi: 10.3390/ijms241612989.
50. Schafer S, Viswanathan S, Widjaja AA, Lim WW, Moreno-Moral A, DeLaughter DM, et al. IL-11 is a Crucial Determinant of Cardiovascular Fibrosis. *Nature*. 2017;552(7683):110-5. doi: 10.1038/nature24676.
51. Działo E, Czepiel M, Tkacz K, Siedlar M, Kania G, Błyszczuk P. WNT/ β -Catenin Signaling Promotes TGF- β -Mediated Activation of Human Cardiac Fibroblasts by Enhancing IL-11 Production. *Int J Mol Sci*. 2021;22(18):10072. doi: 10.3390/ijms221810072.

52. Song T, Gu Y, Hui W, Yang X, Liu Y, Chen X. Oxygen-Glucose Deprivation Promoted Fibroblast Senescence and Collagen Expression Via IL11. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20):12090. doi: 10.3390/ijms232012090.
53. Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ Jr. Gadd45 in Stress Signaling, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2013;793:1-19. doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5_1.
54. Xu J, Du WW, Wu N, Li F, Li X, Xie Y, et al. The Circular RNA circNgn1 mediates Doxorubicin-induced cardiac Remodeling and Fibrosis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;28:175-89. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.007.
55. Zaidi SH, Huang Q, Momen A, Riazi A, Husain M. Growth Differentiation Factor 5 Regulates Cardiac Repair after Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(2):135-43. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.041.
56. Maeda Y, Inoguchi T, Takei R, Hendarto H, Ide M, Inoue T, et al. Chymase Inhibition Prevents Myocardial Fibrosis Through the Attenuation of NOX4-Associated Oxidative Stress in Diabetic Hamsters. *J Diabetes Investig*. 2012;3(4):354-61. doi: 10.1111/j.2040-1124.2012.00202.x.
57. Yu QG, Zhang Y. Transforming Growth Factor- β 1 Mediates NADPH Oxidase 4: A Significant Contributor to the Pathogenesis of Myocardial Fibrosis. *Int J Cardiol*. 2017;227:53-4. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.10.118.
58. Chan EC, Peshavariya HM, Liu GS, Jiang F, Lim SY, Dusting GJ. Nox4 Modulates Collagen Production Stimulated by Transforming Growth Factor β 1 in Vivo and in Vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(3):918-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.138.
59. Ding JF, Sun H, Song K, Zhou Y, Tu B, Shi KH, et al. IGFBP3 Epigenetic Promotion Induced by METTL3 Boosts Cardiac Fibroblast Activation and Fibrosis. *Eur J Pharmacol*. 2023;942:175494. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175494.
60. Li CL, Liu B, Wang ZY, Xie F, Qiao W, Cheng J, et al. Salvianolic Acid B Improves Myocardial Function in Diabetic Cardiomyopathy by Suppressing IGFBP3. *J Mol Cell Cardiol*. 2020;139:98-112. doi: 10.1016/j.yjmcc.2020.01.009.
61. Ruggiero A, Chen SN, Lombardi R, Rodriguez G, Marian AJ. Pathogenesis of Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by Myozenin 2 Mutations is Independent of Calcineurin Activity. *Cardiovasc Res*. 2013;97(1):44-54. doi: 10.1093/cvr/cvs294.
62. Ingles J, Goldstein J, Thaxton C, Caleshu C, Corty EW, Crowley SB, et al. Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes. *Circ Genom Precis Med*. 2019;12(2):e002460. doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002460.
63. Li Q, Zhang K, Zhao X, Wang Y, Li J, Xie Y, et al. miR-199-3p Suppresses Cellular Migration and Viability and Promotes Progesterone Production in Goose Ovarian Follicles Before Selection Through Regulating ITGB8 and Other ECM-related Genes. *Br Poult Sci*. 2023;64(2):275-82. doi: 10.1080/00071668.2022.2159788.
64. Cui Y, Ji J, Hou J, Tan Y, Han X. Identification of Key Candidate Genes Involved in the Progression of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Molecules*. 2021;26(4):1123. doi: 10.3390/molecules26041123.
65. Li W, Lou X, Zha Y, Qin Y, Zha J, Hong L, et al. Single-cell RNA-seq of Heart Reveals Intercellular Communication Drivers of Myocardial Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy. *Elife*. 2023;12:e80479. doi: 10.7554/eLife.80479.

*Material suplementar

Para informação adicional, por favor, clique aqui.



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