



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

**Variabilidade genética em *NOTCH1*: associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos**

VITÓRIA

2021

**ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

**Variabilidade genética em *NOTCH1*: associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

S586v Silva Barcelos, Estevão Carlos, 1988-  
Variabilidade genética em NOTCH1 : associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos / Estevão Carlos Silva Barcelos. - 2021.  
201 f. : il.

Orientadora: Sandra Lúcia Ventrin von Zeidler.  
Coorientadora: Flávia Imbroisi Valle Errera.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Genética da população humana. 2. Genética médica. 3. Biotecnologia. 4. Polimorfismo (genética). 5. Genética e biologia molecular. 6. Farmacogenética. I. Ventrin von Zeidler, Sandra Lúcia. II. Imbroisi Valle Errera, Flávia. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

## **ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

### **Variabilidade genética em *NOTCH1*: associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 03 de setembro de 2021.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

**Prof. Dr. Michel Naslavsky**

Universidade de São Paulo  
Membro externo titular

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Madeira Alvares da Silva**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro interno suplente

**Prof. Dr. Breno Valentin Nogueira**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro interno titular

**Prof. Dr. Marco Cunegundes**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro interno suplente

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia de Paula**

Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro interno titular

**Prof. Dr. Marcelo dos Santos**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Membro externo suplente

**Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba**

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Membro externo titular

**Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Membro externo suplente

VITÓRIA

2021

Em homenagem ao meu querido pai José Carlos Barcelos (*in memoriam*) e a minha amada avó Deonília (*in memoriam*), sempre vivos em mim.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão aos meus pais, Roseli Silva Barcelos e José Carlos Barcelos (*in memoriam*), e a minha irmã Rose Karla, pelo constante incentivo em toda a minha caminhada de estudos, além de serem meus alicerces na vida.

Às orientadoras prof<sup>as</sup> Flávia Imbroisi Valle Errera e Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler por todo apoio, paciência e troca de conhecimento para a minha formação como cientista, além do zelo e amor para o desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigado.

Agradeço ao prof. Michel Naslavsky, à Marília Scliar e toda a equipe envolvida no estudo SABE, desenvolvido em parceria com a Universidade de São Paulo, pela disponibilidade e atenção com o nosso grupo de pesquisa. Assim como, aos participantes do estudo SABE deixo meus mais sinceros agradecimentos.

Ao prof. Paolo Sportoletti e toda sua equipe da Università degli Studi di Perugia (UNIPG), o meu muito obrigado pela generosidade e disponibilidade em me receber em seu grupo de pesquisa e por abrir portas para meu crescimento profissional.

A prof<sup>a</sup> Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni, da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – EMESCAM, pelo apoio em me ajudar a desvendar os mistérios do mundo da estatística.

Agradeço a todos os colegas de laboratório da UFES e da UNIPG, que vivenciaram e participaram dos momentos de discussão e escrita dos trabalhos, além do companheirismo no decorrer dessa jornada. Em especial, aos meus colegas de laboratório da UFES: Lais, Iza, Paola, Karol e Valdemir; e colegas da UNIPG: prof<sup>a</sup>. Emanuela Rosati, Chiara, Filomena, Francesco, Beatrice, Erica, Stefano, Daniele, Arianna, meus sinceros agradecimentos pelo apoio e risadas nesses anos de trabalho.

Meus agradecimentos ao programa de pós-graduação em Biotecnologia – UFES e a coordenadora Prof<sup>a</sup> Sandra por viabilizarem o meu curso de doutorado.

Às agências de fomento CAPES, FAPES, FAPESP e CNPq, deixo o meu muito obrigado por fornecerem todo subsídio para realização deste trabalho científico.

*"A maior sabedoria é admitir a falta da mesma"*  
*(Constantin Stanislavski)*

## RESUMO

SILVA BARCELOS, E. C. **Variabilidade genética em *NOTCH1*: associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos.** 2021. 201f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

NOTCH1 é fundamental para a manutenção de células-tronco e tecidos adultos, e parece atuar como molécula chave no envelhecimento e em diversas condições crônicas, incluindo a obesidade e o câncer, em especial a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC). Recentemente, a via de sinalização de NOTCH1 vêm sendo apontada como fundamental na homeostase de adipócitos, além de estar diretamente ligada ao processo inflamatório. Além disso, a ativação constitutiva da sinalização de NOTCH1 está associada ao mau prognóstico em alguns tipos de câncer, como na LLC onde mutações recorrentes de *NOTCH1* são responsáveis pela estabilização do estado de sinalização. Dado o envolvimento do gene *NOTCH1* no metabolismo e desenvolvimento celular, a hipótese do presente estudo é que variações genéticas de *NOTCH1* estão associadas ao aumento do risco para o excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e também alteram a resposta de células de LLC ao estresse provocado por fármacos. Portanto, como primeiro objetivo, investigamos se variações genéticas em *NOTCH1* estão associadas ao sobrepeso / obesidade em uma coorte de idosos brasileira. Para avaliar a associação dos polimorfismos de *NOTCH1* e o sobrepeso / obesidade, dados antropométricos, bioquímicos, histórico médico e estilo de vida foram coletados. Foram analisados dados de sequenciamento de 1.024 indivíduos (de 59 a 99 anos): 424 apresentavam sobrepeso, 320 obesidade e 280 peso normal. Analisamos cento e sessenta e um tag SNPs abrangendo todo o gene *NOTCH1* e bordas através da abordagem de tagging SNP (frequência de alelo menor  $\geq 0,01$  e desequilíbrio de ligação par a par  $r^2 \geq 0,8$ ). Observamos a associação do SNP rs9411207 com risco de sobrepeso / obesidade sob o modelo aditivo, e a distribuição do genótipo mostrou aumento da frequência de TT homozigoto (OR = 1,50, IC 95%: 1,20-1,88;  $P = 0,0002$ ). O haplótipo GAT construído a partir deste e de outros SNPs em alto desequilíbrio de ligação (DL) foi mais frequente em indivíduos com sobrepeso / obesidade ( $P = 0,003$ ). A análise *in silico* sugeriu que esses SNPs provavelmente afetam a

transcrição de *NOTCH1* e outros genes. Este é o primeiro estudo relatando a associação entre SNPs de *NOTCH1* e risco de sobrepeso / obesidade. Considerando a possibilidade de modulação de *NOTCH1*, estudos populacionais adicionais são necessários para replicar esses resultados e confirmar a utilidade desses genótipos de risco para novas estratégias terapêuticas. Um segundo objetivo foi avaliar se a mutação no gene *NOTCH1* e a desregulação da via *NOTCH1* em casos de LLC alteram a resposta à curcumina. Para isso, investigamos o efeito anti-LLC da curcumina e sua capacidade de interferir na resposta integrada ao estresse (ISR) e na via de sinalização *NOTCH1* em células primárias de LLC com mutação no gene *NOTCH1* e no modelo murino de LLC E $\mu$ -TCL1. Inicialmente, foram analisados dados de expressão gênica de células com mutação c.7544-7545 delCT em *NOTCH1* em confronto com dados de células Wild-Type (WT). A análise *in silico* da expressão gênica das células de LLC mutadas em *NOTCH1* mostrou um aumento na expressão de genes envolvidos no estresse de Retículo Endoplasmático (RE) e ISR. Células primárias de LLC foram coletadas e cultivadas com curcumina, um composto natural que também tem como alvo o estresse do RE, para posterior análise em Western blotting e PCR em tempo real. Após a exposição *in vitro* à curcumina, foram observados mecanismos relacionados ao estresse nas células primárias com *NOTCH1* mutado em comparação com células WT. Essa resposta foi precedida por aumento precoce de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma das células de LLC mutadas em *NOTCH1*, o qual pode desencadear e manter o estresse de RE. Além disso, a curcumina aumentou a apoptose das células de LLC portadoras da mutação em *NOTCH1*, independentemente da carga alélica, quando comparada com células WT. A sinalização de *NOTCH1* também aparece modulada após a exposição à curcumina. Em particular, as células de LLC mutadas em *NOTCH1* mostraram redução na porção ativa de *NOTCH1* (ICN1) e nas proteínas anti-apoptóticas da família BCL2 (BCL2 e MCL1), sendo que a combinação de curcumina com o venetoclax, um anti-BCL2, mostrou ter um efeito sinérgico em células de LLC. Além disso, utilizamos o modelo murino E $\mu$ -TCL1 para avaliação do tratamento com a curcumina. A administração *in vivo* de curcumina no modelo E $\mu$ -TCL1 reduziu significativamente a porcentagem de células leucêmicas CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> infiltrantes no fígado, baço e na medula óssea, com inibição concomitante da sinalização de *NOTCH1* em células leucêmicas na medula óssea. Nossos resultados sugerem que a ativação de ISR induzida pelo estresse de RE e a inibição da sinalização de

NOTCH1 convergem para a amplificação da morte de células de LLC e fornecem um alvo crucial para o tratamento de LLC.

Palavras-chave: *NOTCH1*; Polimorfismo de nucleotídeo único e mutações; Haplótipo; Sobrepeso / obesidade; Leucemia Linfocítica crônica; Resposta integrada ao estresse; curcumina

### ABSTRACT

SILVA BARCELOS, E. C. **Genetic variability in *NOTCH1*: association with overweight/obesity and therapeutic implications in Chronic Lymphocytic Leukemia in elderly.** 2021. 201p. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

NOTCH1 is critical for the maintenance of stem cells and adult tissues, and appears to play as a key molecule in aging and in a variety of chronic conditions, including obesity and cancer, especially Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Recently, the NOTCH1 signaling pathway has been identified as fundamental in adipocyte homeostasis, in addition to being directly linked to the inflammatory process. Furthermore, constitutive activation of NOTCH1 signaling is associated with poor prognosis in some types of cancer such as CLL where recurrent *NOTCH1* mutations are responsible for stabilizing the signaling state. Given the involvement of the *NOTCH1* gene in cell metabolism and development, the hypothesis of the present study is that genetic variations of *NOTCH1* are associated with increased risk for overweight (overweight and obesity) and also alter the response of CLL cells to induced-stress. Therefore, as a first objective, we investigated whether genetic variations in *NOTCH1* are associated with overweight/obesity in a Brazilian elderly cohort. To assess the association of *NOTCH1* polymorphisms and overweight/obesity, anthropometric, biochemical, medical history, and lifestyle data were collected. Sequencing data from 1.024 individuals (aged 59 to 99 years) were analyzed: 424 were overweight, 320 were obese, and 280 were normal weight. We analyzed one hundred and sixty-one tag SNPs spanning the entire *NOTCH1* gene and borders using the SNP tagging approach (minor allele frequency  $\geq 0.01$  and pairwise linkage disequilibrium  $r^2 \geq 0.8$ ). We observed the association of SNP rs9411207 with risk of overweight/obesity under the additive model, and the

genotype distribution showed an increased frequency of homozygous TT (OR = 1.50, 95% CI: 1.20-1.88;  $P = 0.0002$ ). The GAT haplotype constructed from this and other SNPs in high linkage disequilibrium (LD) was more frequent in overweight/obese subjects ( $P = 0.003$ ). *In silico* analysis suggested that these SNPs likely affect the transcription of *NOTCH1* and other genes. This is the first study reporting the association between *NOTCH1* SNPs and risk of overweight/obesity. Considering the possibility of modulation of NOTCH1, additional population studies are needed to replicate these results and confirm the usefulness of these risk genotypes for new therapeutic strategies. A second objective was to evaluate whether the mutation in the *NOTCH1* gene and the deregulation of the NOTCH1 pathway in CLL cases alter the response to curcumin. For this, we investigated the anti-CLL effect of curcumin and its ability to interfere in the integrated stress response (ISR) and in the NOTCH1 signaling pathway in primary CLL cells with mutation in the *NOTCH1* gene and in the murine model of CLL E $\mu$ -TCL1. Initially, gene expression data from cells with c.7544-7545 delCT mutation in *NOTCH1* were analyzed against data from Wild-Type (WT) cells. *In silico* analysis of gene expression of CLL cells mutated in *NOTCH1* showed an increase in the expression of genes involved in Endoplasmic Reticulum (ER) and ISR stress. Primary CLL cells were collected and cultured with curcumin, a natural compound that also targets ER stress, for further analysis by Western blotting and real-time PCR. After *in vitro* exposure to curcumin, stress-related mechanisms were observed in primary cells with mutated *NOTCH1* compared to WT cells. This response was preceded by an early increase in Ca<sup>2+</sup> in the cytoplasm of CLL cells mutated in *NOTCH1*, which can trigger and maintain ER stress. Furthermore, curcumin increased the apoptosis of CLL cells carrying the *NOTCH1* mutation, regardless of allelic load, when compared to WT cells. NOTCH1 signaling also appears modulated after exposure to curcumin. In particular, CLL cells mutated in *NOTCH1* showed a reduction in the active portion of NOTCH1 (ICN1) and in the anti-apoptotic proteins of the BCL2 family (BCL2 and MCL1), and the combination of curcumin with venetoclax, an anti-BCL2, shown to have a synergistic effect on CLL cells. In addition, we used the murine model E $\mu$ -TCL1 to evaluate treatment with curcumin. *In vivo* administration of curcumin in the E $\mu$ -TCL1 model significantly reduced the percentage of CD5+/CD19+ leukemic cells infiltrating the liver, spleen and bone marrow, with concomitant inhibition of NOTCH1 signaling in leukemic cells in the bone marrow. Our results suggest that ER stress-induced ISR activation and

NOTCH1 signaling inhibition converge to amplification of CLL cell death and provide a crucial target for CLL treatment.

Keywords: *NOTCH1*; Single Nucleotide Polymorphism and mutations; Haplotype; Overweight / Obesity; Chronic Lymphocytic Leukemia; Integrated Stress Response; curcumin

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BCR	B-Cell receptor
BTK	Bruton's tyrosine kinase
CD	Cluster of Differentiation
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
DAC	Doença arterial coronária
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DL	Desequilíbrio de ligação
DM2	Diabetes do tipo 2
DNA	Desoxyribonucleic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGCG	Epigallocatechin gallate
FC	Fold-change
FDR	False Discovery Rate
FSP-USP	Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo
GWAS	Genome-wide association study
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Índice de combinação
IMC	Índice de Massa Corpórea
LBM	Linfocitose B monoclonal
LDL	Low Density Lipoprotein
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
NECD	NOTCH extracellular domain
NICD	NOTCH intracellular domain
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial da Saúde

PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RAM	RBP-Jk-Associated Molecule
RBP-Jk	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
SABE	Saúde, Bem Estar e Envelhecimento
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUS	Sistema Único de Saúde
TCF7L2	Transcription Factor 7-like 2 (em itálico: gene)
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
USP	Universidade de São Paulo
WHO	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS (REFERENCIAL TEÓRICO)

<b>Figura 1.</b>	Causas das DCNT.....	21
<b>Figura 2.</b>	Estudos genéticos.....	22
<b>Figura 3.</b>	Tipos de tecido adiposo.....	26
<b>Figura 4.</b>	Via de sinalização NOTCH.....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1 ENVELHECIMENTO, DOENÇAS CRÔNICAS E BASES GENÉTICAS...	22
2.1.1 Envelhecimento e DCNT.....	24
2.1.2 Sobrepeso e obesidade.....	26
2.1.3 Leucemia Linfocítica Crônica.....	29
2.1.3.1 Biologia da LLC.....	31
2.1.4 Variação genética, Desequilíbrio de ligação e Haplótipos.....	32
2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO NOTCH1 E VARIANTES GENÉTICAS.....	35
2.2.1 Genética e estrutura dos receptores NOTCH.....	36
2.2.2. Ativação da via de sinalização NOTCH.....	37
2.2.3 NOTCH no desenvolvimento, metabolismo e adipogênese.....	38
2.2.4 Polimorfismos e mutações em <i>NOTCH1</i> e suas implicações.....	40
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4 MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1 ARTIGO SUBMETIDO: Associação de variantes genéticas em <i>NOTCH1</i> com sobrepeso e obesidade em uma coorte de idosos brasileiros.....	51
5.2 ARTIGO PARA SUBMISSÃO: Resposta integrada ao estresse em Leucemia Linfocítica Crônica.....	98
5.3 ARTIGOS PUBLICADOS.....	146
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>182</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>183</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Há anos o mundo tem vivenciado os efeitos das transições demográficas e epidemiológicas, cujos resultados trouxeram aumento na expectativa de vida e crescimento da população idosa. O envelhecimento resulta em maior suscetibilidade a doenças crônicas, incapacidade, aumento da fragilidade e vem se tornando uma prioridade de saúde pública (FERRUCCI; FABRI, 2018).

Indivíduos idosos tendem a desenvolver um estado pró-inflamatório que é caracterizado por altos níveis de marcadores pró-inflamatórios em células e tecidos, uma condição frequentemente chamada pelo termo em inglês “inflamm-aging”, cunhado pela primeira vez em 2000, por Claudio Franceschi (FRANCESCHI et al., 2000). Fortes evidências indicam que a inflamação é um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV), além de muitas doenças crônicas associadas à idade e outros resultados adversos para a saúde. Os mecanismos potenciais de inflamação incluem: obesidade central, aumento da permeabilidade intestinal, alterações na composição da microbiota, senescência celular, estresse oxidativo causado por disfunções mitocondriais, desregulação das células imunológicas e infecções crônicas (FERRUCCI; FABRI, 2018).

No estudo da velhice humana, denominado “gerociência”, o envelhecimento é tido como a principal causa de muitas doenças crônicas na vida adulta, incluindo Doença de Alzheimer, doença renal crônica, doença arterial coronária (DAC), osteoartrite, acidente vascular cerebral, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e cânceres sólidos como o câncer de mama, de próstata e colorretal e malignidades hematológicas, com destaque para a Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), o tipo de leucemia mais comum em idosos (KENNEDY et al., 2014).

Embora a função declinante seja característica no envelhecimento, as taxas de declínio variam enormemente. Enquanto algumas indivíduos morrem com doenças relacionadas à idade em seus 60 anos de idade, alguns ainda estão ativos aos 100 anos de idade ou mais. Compreender os fatores genéticos que impulsionam esta variabilidade no envelhecimento entre as pessoas é de fundamental importância (LOCKE et al., 2015).

Durante a década passada, diversos estudos de associação do genoma (GWAS) para muitos fenótipos associados ao envelhecimento auxiliaram na descoberta de variantes associadas (TAM et al., 2019). No entanto, uma das principais limitações das abordagens de todo o genoma é a necessidade de adotar um alto nível de significância para os vários testes. Como resultado, GWAS convencionais são insuficientes para detectar toda a herdabilidade explicada por variantes de nucleotídeo único (SNPs) que não superam o *P*-valor estipulado para o estudo de GWAS (MANOLIO et al., 2009; TAM et al., 2019).

Dentre as estratégias discutidas pela comunidade científica para superar a limitação do GWAS mencionada anteriormente, restringir a análise para genes ou vias candidatas pode ser uma alternativa viável. Genes que mostram padrões de expressão diferencial relacionados à condição estudada. Para isto, combinar suporte biológico baseado em evidências com significância estatística aumenta a probabilidade de que o resultado seja um verdadeiro positivo (TAM et al., 2019). Uma vantagem estatística é oferecida quando o número de testes possíveis é reduzido, como por exemplo: pelo ensaio de unidades biológicas, como genes, em vez de variantes únicas.

O estudo de variantes genéticas permite ao pesquisador / médico adaptar o tratamento às características genéticas e genômicas individuais dos pacientes. Conseqüentemente, um biomarcador farmacogenômico é definido como uma característica mensurável de DNA e/ou RNA que é um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos e/ou resposta a intervenções terapêuticas ou outras. Um biomarcador genômico poderia ser, por exemplo, o grau de expressão de um gene, a função de um gene ou a regulação de um gene.

Como um subconjunto da farmacogenômica, a farmacogenética estuda como as variações nas sequências de DNA afetam a resposta a um medicamento. Uma variação genética pode variar de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) à perda de parte de um cromossomo. As principais aplicações dos biomarcadores farmacogenéticos são: a identificação de respondedores e não respondedores a medicamentos, prevenção de eventos adversos e otimização da dose do medicamento (COYLE, 2017).

O presente trabalho foca no estudo do gene *NOTCH1*, membro da via de sinalização NOTCH. A via de sinalização NOTCH é uma via evolutivamente

conservada importante para a comunicação célula-célula e determinação do destino da célula durante o desenvolvimento. A via NOTCH vem sendo apontada como importante reguladora do metabolismo. Estudos recentes apontam o papel fundamental do NOTCH1 na regulação do metabolismo, com papel fundamental na homeostase da adipogênese e angiogênese metabólica. A modulação/inibição da via de sinalização de NOTCH1 promove a diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais e parece promover escurecimento (aparecimento de adipócitos bege no tecido adiposo branco-WAT) e resistência à obesidade induzida por dieta rica em gordura em camundongos (BI et al., 2014a, 2014b). Além disso, *NOTCH1* está localizado no cromossomo humano 9q34 e deleções crípticas dessa localização genômica foram associadas à obesidade e síndromes de retardo mental (CORMIER-DAIRE et al., 2003).

Estudos extensos indicaram que a alteração da expressão de NOTCH1 está implicada no desenvolvimento de doenças e síndromes. Mutações e polimorfismos no gene *NOTCH1* estão associadas à suscetibilidade ao câncer em diversas populações (SHAH et al., 2020), além de mau prognóstico, como no caso da LLC (ROSATI et al., 2018a). No entanto, diversos estudos também demonstraram a implicação de SNPs de *NOTCH1* em doenças não tumorais, como malformações de desenvolvimento; por exemplo, válvula aórtica bicúspide (GARG et al., 2005), condições de estresse no início da vida (STEINE et al., 2016) e susceptibilidade a doenças no estilo de vida (DING et al., 2018b).

A sinalização de NOTCH1 desregulada está implicada na proliferação, resistência à apoptose e sobrevivência de células de LLC (ROSATI et al., 2018). Lesões genéticas de *NOTCH1* são responsáveis pelo acúmulo do domínio intracelular de NOTCH1 (ICN1) e subsequente estabilização da via de sinalização. A LLC com mutação em *NOTCH1* está associada ao prognóstico desfavorável, refratariedade ao tratamento e maior risco de transformação em síndrome de Richter (ARRUGA et al., 2014; PUENTE et al., 2011; SPOROLETTI et al., 2010). Neste contexto, estudos anteriores mostraram que células cancerosas com altas taxas de crescimento possuem alteração na capacidade da maquinaria do retículo endoplasmático (RE) que envolve o processo de síntese de proteínas e representa um alvo em potencial para a terapêutica (C; FR, 2018; CUBILLOS-RUIZ; BETTIGOLE; GLIMCHER, 2017).

Em células estressadas, o RE desencadeia uma cascata de vias de sinalização conhecida como resposta de proteína não dobrada ou UPR (do inglês, Unfolded Protein Response), causada pelo acúmulo de proteínas não dobradas ou dobradas incorretamente no RE. Essa resposta é seguida pela dissociação da proteína chaperona regulada por glicose 78 (HSPA5 / GRP78, também conhecida como BiP) e, posteriormente, ativação de três sensores ativadores UPR: quinase ER semelhante a PKR (PERK), fator de transcrição 6 ativado (ATF6) e endonuclease 1 $\alpha$  regulada por inositol (IRE $\alpha$ ). O sensor PERK é um membro da resposta integrada ao estresse (ISR), um processo que leva a um desligamento global da tradução e à indução de genes selecionados, como o fator de transcrição ATF4, cujo objetivo principal é restaurar o equilíbrio aumentando a resistência e adaptabilidade. No entanto, sob estresse severo e prolongado, o programa homeostático pode conduzir a sinalização em direção à morte celular, por meio de interações com a proteína homóloga C / EBP pró-apoptótica (CHOP) (Marciniak et al, 2004).

Estudos anteriores mostram que a inibição da sinalização de NOTCH1 pelo inibidor de  $\gamma$ -secretase (GSI) desencadeia estresse de RE, inibição de proteassoma e induz em células de LLC à apoptose (ROSATI et al., 2012). Em outro contexto que não a LLC, o composto natural curcumina exibiu atividade tanto como indutor de estresse de RE quanto como inibidor de NOTCH1 (ANGELO; KURZROCK, 2009; REN et al., 2019). Esse composto aparece com diversas ações farmacológicas, incluindo anticâncer, antioxidante, antiinflamatório, imunomodulador e regulador de lipídios (KUNNUMAKKARA et al., 2019).

Dado o envolvimento do gene *NOTCH1* no desenvolvimento celular e metabolismo, a hipótese do presente estudo é que variações genéticas de *NOTCH1* estão associadas ao aumento do risco para o excesso de peso (sobrepeso e obesidade) e também alteram a resposta a curcumina em células de LLC.

Tendo em vista que a melhor compreensão de marcadores genéticos auxilia no desenvolvimento de novas metodologias de saúde para a prevenção e tratamento das doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento, a perspectiva biotecnológica deste estudo consistiu em identificar polimorfismos genéticos para a futura composição de um painel contendo marcadores de risco para a obesidade

e doenças relacionadas, assim como avaliar alterações em vias celulares e mecanismos que podem ser usadas como alvo em células de LLC na resposta a fármacos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ENVELHECIMENTO, DOENÇAS CRÔNICAS E BASES GENÉTICAS

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) estão relacionadas a causas múltiplas e possuem longa ou indefinida duração. Devido a sua alta ocorrência e expressão no padrão de morbidade adulta, as DCNT constituem um dos principais problemas de saúde mundial (RACHEL, 2019).

O aumento da prevalência de DCNT registrado no último século está diretamente relacionado às mudanças demográficas profundas sofridas em nossa sociedade, sobretudo no que se refere ao envelhecimento global. Este processo pelo qual o padrão de morbidade e mortalidade é alterado de uma população jovem para uma população idosa é conhecido pelo termo “transição epidemiológica”, intimamente associado com avanços científicos e tecnológicos, bem como o desenvolvimento da urbanização, sanitização e alimentação (BRUCE; JOEL W; JONATHAN L, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCNT constituem a maior causa de morte e incapacidade em todo o mundo (JAUL; BARRON, 2017). O número de mortes causadas por condições crônicas é duas vezes maior que àquelas por doenças infecciosas, incluindo HIV/AIDS, tuberculose e malária; deficiências nutricionais e problemas gestacionais. Aproximadamente 80% das mortes causadas por doenças crônicas são registradas em países de baixa ou média renda (HUNTER; REDDY, 2013).

No Brasil, as DCNT constituem um problema de saúde público, representando 72% de todas as mortes, principalmente em indivíduos idosos, com baixa renda e escolaridade (HÖFELMANN et al., 2018; HUNTER; REDDY, 2013). A prevalência de ao menos uma DCNT na população brasileira é de 43%, sendo que os indivíduos mais afetados são àqueles habitantes da região Sudeste, caucasianos, do sexo feminino, pouco escolarizados e com baixa posição socioeconômica (MA et al., 2021).

Entre os fatores de risco comuns para as DCNT, podemos encontrar os fatores modificáveis: alimentação não saudável, inatividade física e o tabagismo; assim como fatores não modificáveis: envelhecimento e hereditariedade (WHO, 2021). Além disso, fatores de risco metabólicos contribuem para as quatro principais mudanças associadas ao aumento de risco para DCNT, sendo essas: o sobrepeso e a obesidade; a hipertensão, a hiperglicemia (altos níveis de glicose no sangue) e a hiperlipidemia (altos níveis de gordura no sangue), como representado na figura 1.

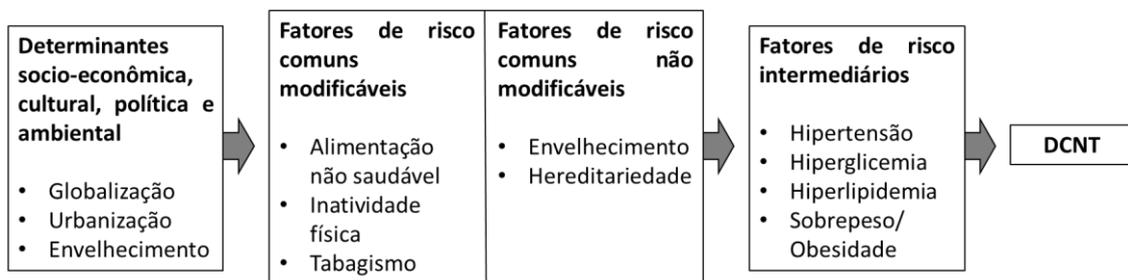


Figura 1. Causas das DCNT. Determinantes e Fatores de risco comuns às DCNT. Extraído e adaptado de: WHO, 2021.

Características complexas, como as DCNT e o envelhecimento per si, apresentam uma forte interação genética com fatores ambientais e de estilo de vida, diferindo, portanto, das conhecidas “doenças mendelianas”, onde alterações na sequência de DNA produzem o estado patológico. Assim sendo, o estudo de características complexas se torna mais desafiador (ZONDERVAN; CARDON, 2007).

Em condições mendelianas dominantes, a presença de uma única cópia de um gene mutado é responsável pela doença; ou seja, a mutação tem um tamanho de efeito muito alto. Em desordens autossômicas recessivas, dois alelos mutantes do mesmo gene conferem o estado de doença. Estudos de análise de ligação em famílias grandes (“Family-based linkage analysis”) auxiliaram a descoberta das alterações gênicas associadas às doenças. A ligação determina a seção de genoma compartilhado pelos familiares afetados. Essa região compartilhada deve conter a mutação que causa a doença genética, tornando possível o estudo da hipótese biológica (MULLEN et al., 2009).

No entanto, quando as famílias de indivíduos com doenças genéticas não-Mendelianas (ou características complexas) são estudadas, parentes próximos são

afetados em taxas superiores à população, mas sem padrões de herança que sugerem um único gene causador. Acredita-se que vários alelos diferentes de vários genes, combinados com fatores ambientais, resultam em doenças. Ao longo da última década, os estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificaram um grande número de variantes genéticas comuns associadas ao risco para características complexas (SCOTT et al., 2017; WILD et al., 2017). Neste contexto, a abordagem do GWAS se baseia no estudo de um inteiro genoma, enquanto outra abordagem, o estudo de associação gene-candidato, se baseia em um número limitado de genes pré-especificados que possuem alta relevância biológica para a característica complexa estudada, como mostrado na figura 2.

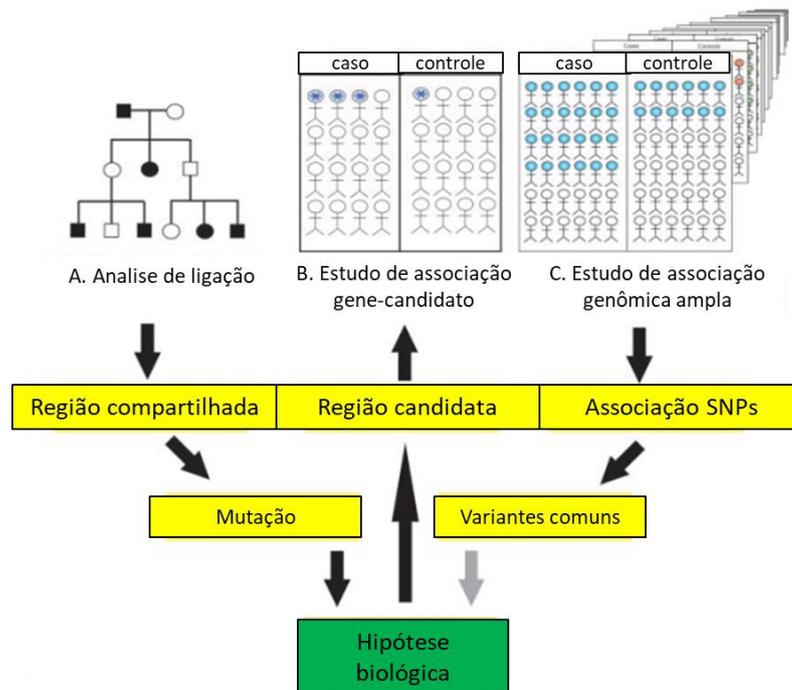


Figura 2. Estudos genéticos. Análise de ligação (“family-based linkage analysis”) e estudos de associação gene-candidato e de genômica ampla (“Genome-Wide association studies”). Extraído e adaptado de: MULLEN et al., 2009.

### 2.1.1 Envelhecimento e DCNT

O envelhecimento da população humana constitui um fenômeno mundial e representa um dos principais desafios da biologia e medicina atuais. Segundo a OMS, a proporção da população mundial com mais de 60 anos dobrará em

aproximadamente 35 anos (BEARD et al., 2016). De 2012 a 2022 a taxa de crescimento anual da população idosa atingirá 4% ao ano, com previsão de 41,5 milhões de idosos em 2030 (RIBEIRO; et al., 2020). Uma projeção semelhante feita para a população brasileira realizada pelo IBGE indica que, em 2060, um em cada quatro indivíduos terá mais de 65 anos (IBGE, 2013), o que provocará mudanças na pirâmide etária, com o estreitamento da população jovem e adulta e alargamento no topo (CASTRO et al., 2021; SIMÕES, 2016). O impacto desta nova “ordem demográfica” reflete a urgência da atenção integral à saúde da pessoa idosa.

O envelhecimento biológico pode ser entendido como o declínio progressivo das funções biológicas intrínsecas (ACIOLE; BATISTA, 2013; DUARTE et al., 2019). Esse processo complexo é refletido na limitação das capacidades regenerativas dos tecidos de um organismo idoso que diferem de um tecido com sua competência proliferativa preservada (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). Por sua vez, uma disfunção do sistema leva ao aumento da susceptibilidade às DCNT relacionadas com a idade e, conseqüentemente, o aumento da taxa de morbimortalidade em indivíduos idosos (HARMAN, 1988). Portanto, a presença de doenças comuns ao envelhecimento, como: câncer, Doenças Cardiovasculares (DCV), doenças pulmonares, Diabetes do tipo 2 (DM2), ou doenças com perda de funções cognitivas; se encontra intimamente associado com o chamado “envelhecimento não saudável” (HALASCHEK-WIENER et al., 2009; NICCOLI; PARTRIDGE, 2012).

Neste contexto, o declínio da massa e força muscular se inicia na quarta década de vida. Aos 80 anos, aproximadamente 20% das pessoas apresentam sarcopenia, com significativa perda de massa e força muscular (RICHARD MATTHEW et al., 2017). A inflamação crônica, o declínio dos níveis hormonais, diminuição da função mitocondrial muscular, e prejuízo na função das células-tronco musculares são fatores importantes para a sarcopenia (JEREMY D, 2012). Esse declínio na massa muscular e aumento da gordura corporal contribuem para mudanças na farmacocinética. Indivíduos idosos devem consumir menos medicação quando comparados com indivíduos mais jovens.

Além disso, as mudanças relacionadas com a idade também afetam o sistema imune, mediadas, em grande parte, pelo estado de pré-inflamação e inflamação crônica. Os indivíduos idosos apresentam um declínio na função das

células B, na geração e função de células T, além de disfunção na imunidade inata (BANDARANAYAKE; SHAW, 2016). A inflamação crônica e as mudanças na resposta imune constituem um importante fator de risco para a morbidade e mortalidade em idosos, e é hipotetizado como um fator condutor para as DCNT (HAYNES, 2020).

### 2.1.2 Sobrepeso e obesidade

O sobrepeso e a obesidade são considerados fatores de risco para o surgimento de várias DCNT. A obesidade consiste em uma doença multifatorial associada à inflamação sistêmica crônica e é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal na forma de tecido adiposo branco ou WAT (do inglês, White Adipose Tissue).

A obesidade está se expandindo a uma taxa preocupante, a frequência de sobrepeso e obesidade combinados aumentou 27,5% para adultos e 47,1% para crianças entre 1980 e 2013. Nos países em desenvolvimento, a proporção de adultos obesos aumentou de cerca de 20% em 1980 para mais de 20% em 2013 (MARIE et al., 2014).

Para medir a obesidade, os pesquisadores costumam usar uma escala conhecida como índice de massa corporal (IMC). O IMC é calculado dividindo o peso de uma pessoa (em quilogramas) pela sua altura (em metros) ao quadrado (comumente expressa como  $\text{kg} / \text{m}^2$ ). De acordo com esse cálculo, os indivíduos com peso normal se encontram com IMC entre 18,5 e 24,9, enquanto indivíduos com sobrepeso possuem IMC acima de 25, sendo que obesos são classificados na categoria de IMC acima de 30. O IMC fornece uma medida mais precisa da obesidade do que apenas o peso e, para a maioria das pessoas, é um indicador bastante bom (embora indireto) da gordura corporal (WHO, 2021).

Sabe-se que a localização abdominal de gordura (obesidade central) se mostra mais associada a distúrbios metabólicos e riscos cardiovasculares como dislipidemias, DM2 e hipertensão arterial (SANGMI et al., 2009). Além disso, há evidências consistentes de que maiores quantidades de gordura corporal estão associadas a riscos aumentados de vários tipos de câncer (LAUBY-SECRETAN et al., 2016). A obesidade não apenas aumenta o aparecimento de desequilíbrios

metabólicos, mas também diminui a expectativa de vida e impacta os processos celulares de maneira semelhante ao envelhecimento (REXFORD S, 2009).

Com base em diversos estudos, duas hipóteses distintas podem ser propostas. Uma é que as respostas celulares provocadas por um excesso de nutrientes causam obesidade, e que a obesidade é responsável por acelerar o ritmo de envelhecimento. Apoiando essa hipótese estão as observações de que o nocaute do receptor de insulina específico para a gordura, para produzir camundongos extremamente magros (LOCKE et al., 2015), e a remoção da gordura visceral em ratos (RADHIKA et al., 2008), aumentaram a expectativa de vida (C et al., 2015). A possibilidade alternativa é que as respostas celulares provocadas por um excesso de nutrientes sejam responsáveis por aumentar o ritmo de envelhecimento. Este solo comum compartilhado por envelhecimento e obesidade foi chamado de "adipaging" (LAURA M et al., 2016), e há algumas evidências de pontos comuns: a hiperglicemia, por exemplo, induz a senescência em células endoteliais e macrófagos (FRANCESCO et al., 2018), enquanto a redução de glicose a impede, em células-tronco mesenquimais humanas (TING et al., 2011).

Se a hiperfunção / disfunção do tecido adiposo é causa do declínio funcional do envelhecimento ou representa simplesmente um marcador do avanço do processo de envelhecimento, ficará mais claro em estudos futuros. Além disso, nem todos os depósitos de gordura são iguais em seu impacto para a saúde (DEREK M; N, 2010) e também pode acontecer que ambas as hipóteses sejam simultaneamente verdadeiras (MICHAEL B et al., 2017).

O tecido adiposo marrom ou BAT (do inglês, Brown Adipose Tissue) têm como função principal a termogênese, ou seja, a capacidade de queimar calorias para gerar calor, em mamíferos. Estudos com roedores mostram que a atividade termogênica do BAT pode proteger contra a obesidade (CARSTEN T; FIORAN W, 2019). Descobertas recentes usando novos procedimentos de radiodiagnóstico revelaram alta atividade inesperada de BAT em humanos adultos (KIRSI A, 2016). Além disso, processos complexos de diferenciação celular que levam ao aparecimento de adipócitos marrons ativos foram recentemente identificados. Os adipócitos marrons agrupados em depósitos anatômicos de roedores surgem de células precursoras mesenquimais comuns à linhagem de células miogênicas. Eles

estão sendo chamados de adipócitos marrons “clássicos” ou “programados para o desenvolvimento” (TIZHONG et al., 2013).

No entanto, os adipócitos marrons podem aparecer após estímulos termogênicos em locais anatômicos correspondentes ao WAT. Este processo é denominado “escurecimento” do WAT. Os adipócitos marrons que aparecem no WAT derivam de células precursoras diferentes daquelas no BAT clássico e estão mais próximos da linhagem de células de adipócitos brancos. Esses adipócitos marrons que aparecem no WAT são frequentemente chamados de "indutíveis, bege ou brite". O aparecimento desses adipócitos marrons induzíveis no WAT também pode envolver processos de transdiferenciação de células adiposas brancas a marrons (ZOICO et al., 2019), como demonstrado na figura 3.

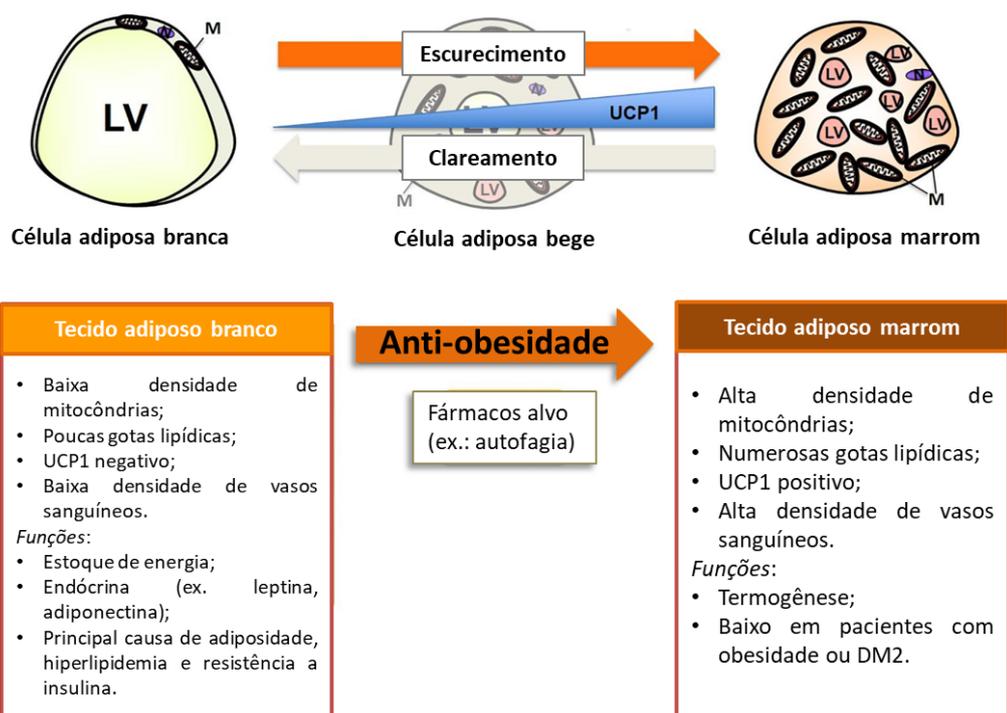


Figura 3: Tipos de tecido adiposo. Células adiposas branca, bege e marrom. Características e funções dos tecidos adiposo branco e marrom. Extraído e adaptado de: RO et al., 2019.

Não há evidências de que a função termogênica final dos adipócitos bege / brite difere daquela dos adipócitos marrons clássicos, embora alguns dados genéticos em roedores sugiram um papel relevante do processo de escurecimento na proteção contra a obesidade. Embora a ativação do BAT clássico e o processo

de escurecimento compartilhem mecanismos comuns de indução (por exemplo, indução mediada por noradrenérgicos pelo frio), vários novos fatores endócrinos independentes adrenérgicos que ativam o BAT e o escurecimento do BAT foram identificados recentemente. Em humanos adultos, o BAT é composto principalmente de adipócitos bege / brite, embora dados recentes indiquem a persistência do BAT clássico em alguns sítios anatômicos (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; WHITEHEAD et al., 2021). Compreender os processos biológicos que controlam a atividade e diferenciação dos adipócitos marrons pode ajudar na concepção de estratégias focadas no BAT para aumentar o gasto de energia e lutar contra a obesidade.

### 2.1.3 Leucemia Linfocítica Crônica

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é um tipo de DCNT e representa um dos tipos de câncer mais comumente encontrados entre 60 e 80 anos. Cerca de 90% das pessoas diagnosticadas com a LCC possuem 50 anos ou mais. Sendo a leucemia mais comum no mundo Ocidental, a LLC é comumente diagnosticada em indivíduos idosos e abrange cerca de 40% de todas as leucemias em indivíduos adultos. No Brasil, a média de idade no diagnóstico da LLC é de 66 anos e sua incidência varia em torno de 0,3 a 0,8 por 100.000/ano (GONÇALVES et al., 2017). Indivíduos com ascendência caucasiana se encontram no grupo de risco, quando comparadas a afro-americana e asiática (YANG et al., 2015).

A LLC representa e corresponde a uma neoplasia hematológica caracterizada pelo acúmulo de células B no sangue periférico, medula óssea e órgãos linfóides sólidos. O desenvolvimento da LLC, em geral, é precedido por um estado assintomático designado Linfocitose B monoclonal (LBM) onde aproximadamente 50% dos pacientes apresentam aumento da contagem de linfócitos B no sangue periférico sem causa determinada. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a LLC é caracterizada pela presença, no sangue, de mais de 5 mil linfócitos clonais B com imunofenótipo caracterizado pela fraca expressão dos marcadores B (CD19, CD20, CD23, IgM e/ou IgD de superfície) e alta expressão do marcador T CD5 (MATUTES et al., 1994).

Apesar de ser assintomático em muitos casos, possíveis sintomas encontrados em pacientes com LLC incluem fadiga, febre, infecções recorrentes e perda de peso. Outros achados comuns incluem: linfadenopatia, hepatomegalia e

esplenomegalia, assim como, infiltração na medula óssea resultando em anemia e trombocitopenia, devido a falhas no desenvolvimento da hematopoiese .

Os critérios para iniciar o tratamento podem variar de acordo com o estágio do paciente. Na prática geral, os pacientes com doença em estágio inicial assintomática devem ser monitorados sem terapia, a menos que tenham evidência de progressão da doença ou sintomas relacionados à doença. Vários estudos mostraram que o tratamento de pacientes com doença em estágio inicial não resulta em benefício de sobrevida; portanto, uma terapia de intervenção precoce com medicamentos antileucêmicos, incluindo inibidores de sinalização ou antagonistas de Bcl2, isoladamente ou em combinação com anticorpos monoclonais, atualmente não é indicada (HALLEK et al., 2018).

A quimioimunoterapia tem sido o tratamento de primeira linha padrão de pacientes com LLC. Nos últimos anos, grandes avanços foram feitos no entendimento da biologia da LLC e, felizmente, várias dessas descobertas estão sendo feitas seu caminho para as clínicas. Estes incluem novos anticorpos monoclonais CD20 (mAb) (ofatumumabe e obinutuzumabe), inibidores da tirosina quinase de Bruton (BTK) (ibrutinibe), inibidores da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (idelalisibe), inibidores de Bcl-2 (ABT-199 ou venetoclax) e vários outros (RAI; JAIN, 2016).

O tratamento alopático convencional é indicado somente em casos avançados da doença devido a toxicidade das drogas. A avaliação da toxicidade relacionada ao tratamento requer uma consideração cuidadosa das manifestações da doença subjacente e das reações adversas previstas aos agentes usados na terapia. Um exemplo é a toxicidade hematológica; os pacientes com LLC avançada geralmente têm citopenias que podem ser causadas pela LLC subjacente e / ou terapia anterior (RAI; JAIN, 2016).

Devido ao aumento dos efeitos colaterais das drogas no controle da LLC, estudos com o uso de produtos naturais em pacientes têm sido realizados. Alguns dos produtos naturais estudados são: resveratrol, genisteína, epigallocatequina galato e curcumina (KUMAR; SHANBHAG, 2017).

A curcumina causa a liberação de citocromo c da membrana mitocondrial, que pode contribuir para a apoptose de células de CLL. A curcumina é conhecida por potencializar as ações da vincristina nas células B da LLC *in vitro*. O EGCG é o principal polifenol presente no chá verde. EGCG e curcumina são ambos capazes de induzir poli (ADP-ribose) clivagem da polimerase (PARP) e inibição da atividade da telomerase em células de CLL. A curcumina não ativa a caspase-3 enquanto EGCG ativa caspase-3 enquanto induz a clivagem de PARP e apoptose em B-CLL (ANGELO; KURZROCK, 2009).

### 2.1.3.1 Biologia da LLC

Embora a exata causa da LLC seja ainda desconhecida, esta neoplasia é observada associada a danos nos genes relacionados ao desenvolvimento de linfócitos na medula óssea. Em adição, estas alterações estão correlacionadas com a mudança da meia-vida das células, tornando-as resistentes a apoptose, mecanismo na qual normalmente seriam renovadas. O estado mutacional das células LLC pode progredir devido ao acúmulo de lesões genéticas, mudanças epigenéticas e fatores ambientais. Linhas de pesquisa evidenciam que o surgimento destas mutações e alterações epigenéticas pode ter seu surgimento ainda nas células tronco hematopoiéticas.

Coletivamente, oito principais vias estão frequentemente alteradas em LLC, incluindo a sinalização BCR, a regulação do ciclo celular, apoptose, a resposta ao dano ao DNA, remodelamento da cromatina, a sinalização NF- $\kappa$ B, a sinalização NOTCH1 e o metabolismo de RNA (PUENTE et al., 2015).

Através de estudos do sequenciamento genômico e exômico em pacientes de LLC foram identificadas mutações gênicas recorrentes. No diagnóstico, o gene mais frequentemente encontrado com mutações é o *NOTCH1*, seguido por *ATM*, *SF3B1*, *BIRC3*, *CHD2*, *TP53* and *MYD88* (NADEU et al., 2016; PUENTE et al., 2011).

Mutações em *NOTCH1* provocam um efeito estabilizador na sinalização de NOTCH1 em células de LLC, e consequente resistência a apoptose (IANNI et al., 2009). Além disso, novas evidências descrevem mecanismos da ativação de NOTCH1 independentemente do status mutacional (FABBRI et al., 2017). A ativação constitutiva de NOTCH1 é associada com pior prognóstico na LLC (SPORTOLETTI

et al., 2010). Portanto, a via de sinalização NOTCH1 representa uma peça chave nas terapias atuais e futuras para a LLC.

#### 2.1.4 Variação genética, Desequilíbrio de ligação e Haplótipos

A variação genética é gerada continuamente pelo processo mutacional, mas sua persistência no genoma é determinada por diferentes fatores históricos e genômicos. A maioria das novas mutações que afetam a função do gene têm efeitos deletérios na aptidão reprodutiva. No entanto, como os genes representam apenas uma pequena fração do genoma humano, acredita-se que a maioria das mutações são neutras e não tem efeito sobre a aptidão reprodutiva (ELLEGREN; GALTIER, 2016).

A maioria das variantes de DNA no genoma humano é considerada seletivamente neutra por três razões principais. Em primeiro lugar, a porção principal do genoma, estimada em cerca de 97%, não codifica um produto funcional, como proteína ou ácido ribonucléico (RNA), nem afeta indiretamente a função do gene, regulando a expressão ou replicação. Em segundo lugar, se uma nova variante ocorrer em 1,5% do genoma que codifica um produto funcional (regiões codificantes), pode não resultar em uma mudança de aminoácido (ou seja, pode ser uma substituição "sinônima"). Terceiro, as variantes que afetam as regiões regulatórias ou codificadoras e alteram um aminoácido (substituições não-sinônimas) podem não ter efeito sobre a aptidão reprodutiva (WRIGHT, 2005).

O polimorfismo genético é definido como a herança de uma característica controlada por um único locus genético com dois alelos, em que o alelo menos comum tem uma frequência de cerca de 1% ou mais. Polimorfismos e mutações são duas alterações genéticas frequentes. Essas variações são representadas por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), alterações na organização ou no tamanho das seqüências, incorporação do DNA extracromossômico e alterações anafásicas ou da citocinese e incluem: substituições, inserções, duplicações e fusões de nucleotídeos (ISMAIL; ESSAWI, 2012).

Essas variações genéticas podem ser o resultado de processos casuais ou podem ter sido induzidos por agentes externos, como vírus ou radiação. Se uma diferença na seqüência de DNA entre os indivíduos estiver associada a doenças,

geralmente será chamada de mutação genética. Mudanças na sequência de DNA que foram confirmadas como causadas por agentes externos também são geralmente chamadas de "mutações" em vez de "polimorfismos". Os SNPs são o tipo mais comum de variações genéticas em humanos. Compreender as funções dos SNPs pode nos ajudar muito a entender a genética da variação do fenótipo humano, especialmente a base genética de doenças humanas complexas (BULL, 2013; ISMAIL; ESSAWI, 2012).

Os polimorfismos de DNA compreendem três tipos: polimorfismo de repetição em tandem, variações do número de cópias e SNPs. A detecção desses polimorfismos pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo PCR específico de alelo, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição, a técnica de microarray e sequenciamento do genoma completo (ISMAIL; ESSAWI, 2012).

A descoberta e genotipagem de diversos polimorfismos de nucleotídeo único ou SNPs permite o mapeamento desses padrões ao longo do genoma por associações não aleatórias, chamados de desequilíbrio de ligação ou LD (do inglês, Linkage Disequilibrium) (GABRIEL et al., 2002). O LD é um indicador sensível das forças genéticas populacionais que estruturam um genoma. Por causa do crescimento explosivo dos métodos para avaliar a variação genética em uma escala fina, os biólogos evolucionistas e os geneticistas humanos estão cada vez mais explorando o desequilíbrio de ligação para entender eventos evolutivos e demográficos passados, para mapear genes que estão associados a caracteres quantitativos e doenças hereditárias, e para compreender a evolução conjunta de conjuntos de genes ligados. Atualmente, o desequilíbrio de ligação é usado muito mais extensivamente no estudo de humanos do que em não humanos, mas isso está mudando à medida que avanços tecnológicos tornam extensos estudos genômicos viáveis em outras espécies (H; R; MH, 2003).

Em particular, a clonagem posicional de genes para suscetibilidade a doenças depende do desequilíbrio de ligação (LD) e correlações entre alelos de variações vizinhas, refletindo "haplótipos" descendentes de um cromossomo ancestral comum. Tornou-se claro que SNPs mapeados e ordenados cromossomicamente podem ser agrupados em "blocos de haplótipos" que abrigam um número limitado de haplótipos distintos (GABRIEL et al., 2002). Um haplótipo é um conjunto de alelos co-herdados

específicos; normalmente, esses alelos são co-herdados porque estão presentes em marcadores genéticos vizinhos. Um indivíduo que carrega o mesmo alelo em ambas as cópias de um locus é homocigoto para esse alelo, enquanto alguém que carrega dois alelos diferentes é heterocigoto. Neste contexto, marcadores genéticos são sequências específicas de DNA polimórficas e empregadas no mapeamento de genes de doenças (CRAWFORD; NICKERSON, 2005; H; R; MH, 2003).

Vários estudos mostraram que o genoma humano é estruturado com tais segmentos dentro dos quais há forte LD entre SNPs relativamente comuns, mas entre os quais a recombinação deixou pouco LD (Patil et al. 2001). Quando os SNPs estão em LD forte, os alelos de alguns SNPs em um haplótipo sugerem os alelos dos outros SNPs, que, como resultado, fornecem informações redundantes. Conseqüentemente, um número modesto de SNPs comuns selecionados de cada segmento seria suficiente para definir os haplótipos relevantes em presumivelmente qualquer população (WALL; PRITCHARD, 2003).

Essa hipótese levou ao projeto HAPMAP (<http://www.hapmap.org>), que visa desenvolver um mapa de padrões de haplótipos comuns em todo o genoma em várias populações étnicas. Uma vez que cada gene (ou fragmento cromossômico) é subdividido em blocos de haplótipos, os haplótipos podem ser “marcados” por um subconjunto de todos os SNPs disponíveis, os chamados SNPs de marcação. Espera-se que a construção de um mapa de haplótipos do genoma humano e a definição de SNPs de marcação facilite os estudos de associação de variação genética comum, em particular, para determinar alelos causadores de doenças ainda não identificados (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2005).

O conhecimento da região candidata auxilia na escolha de um grupo de variantes (tag SNPs) que captura a maioria das variantes genéticas comuns na predição do status alélico de SNPs próximos (ZONDERVAN; CARDON, 2007).

Os polimorfismos contribuem com grandes variações no genoma humano e podem definir como os indivíduos respondem aos medicamentos, seja alterando a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos ou alterando a resposta celular aos agentes terapêuticos. Definir o efeito dos polimorfismos nos alvos dos quimioterápicos é necessário para a predição da farmacocinética alterada dos agentes terapêuticos (KOCAL; BASKIN, 2017). Portanto, o estudo e a identificação

de mutações e polimorfismos que impactam o risco de DCNT e/ou seus fatores de risco, assim como à resposta a fármacos por esses indivíduos é de fundamental importância.

## 2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO NOTCH1 E VARIANTES GENÉTICAS

A sinalização NOTCH desempenha um papel na maioria dos programas de desenvolvimento de órgãos e tecidos e freqüentemente atua iterativamente durante a divisão e diferenciação celular. Existem muitas situações onde a sinalização NOTCH bloqueia a diferenciação e assegura um pool de células-tronco ou progenitoras, mas também há situações onde dois destinos celulares diferenciados são o resultado potencial para uma célula tronco ou progenitora e dita a sinalização NOTCH o equilíbrio entre os dois destinos de células disponíveis (CAPACCIONE; PINE, 2013).

Altamente conservada entre as espécies (YAMAMOTO; SCHULZE; BELLEN, 2014), a via de sinalização NOTCH foi descoberta e descrita após a observação de diferentes fenótipos nas asas de *Drosophila melanogaster* causadas pela haploinsuficiência da região cromossômica codificante para *NOTCH* (MOHR, 1919). Adicionalmente, a análise genética da via de sinalização NOTCH em *Caenorhabdits elegans* trouxe contribuições essenciais para o entendimento dos mecanismos moleculares deste sistema (GREENWALD; KOVALL, 2013). Como exemplo, a proteína glp-1, codificada pelo gene homólogo de *NOTCH* em *C. elegans*, é requerida continuamente na proliferação da linhagem germinativa, e sua mutação provoca a formação de tumores na espécie (BERRY; WESTLUND; SCHEDL, 1997). Em humanos, *NOTCH* foi primeiramente identificado como um gene cuja translocação cromossômica t(7;9) (q34;q34.3) estaria presente em células T leucêmicas (ELLISEN; BIRD; WEST, 1991).

Diversas evidências mostram que a sinalização NOTCH desempenha um papel fundamental na homeostase dos tecidos. A homeostase do tecido é definida como a manutenção de um estado estacionário através de um equilíbrio de proliferação e apoptose, e permite que um tecido responda dinamicamente a várias condições fisiológicas e também, em alguns casos, para montar uma defesa contra lesões e doenças (SIEBEL; LENDAHL, 2017).

A perturbação da via de sinalização NOTCH está ligada a uma variedade de doenças genéticas, não tumorais e cânceres. Além disso, estudos recentes empregando modelos de camundongos transgênicos de manipulação específica de tecido da sinalização NOTCH começaram a revelar os papéis da via NOTCH na regulação do metabolismo (SIEBEL; LENDAHL, 2017).

### 2.2.1 Genética e estrutura dos receptores NOTCH

Membros da família NOTCH codificam quatro tipos de receptores transmembranares (NOTCH1-4), codificadas nas regiões cromossômicas 9q34, 1p13-p11, 19p13, 2-p13.1 e 6p21.3, respectivamente (KOJIKI; GRIFFIN, 2001). Estes receptores agem através da interação com diferentes ligantes de superfície celular, sendo eles: Jagged1, Jagged2 e Ligantes Delta-like 1, 3 e 4 (DLL1, DLL3 e DLL4). (TEJADA et al., 2014). Os ligantes de NOTCH são descritos na literatura comumente como presentes em células adjacentes influenciando somente a expressão gênica de células vizinhas. Entretanto, evidências recentes revelam a existência de ativação da via ligando-independente, por exemplo: o ligante Jagged1 pode ser secretado, ativando a sinalização NOTCH sem a necessidade do contato célula-célula (LU et al., 2013).

Os receptores NOTCH e seus ligantes são constituídos por proteínas multidomínio, sendo que os ectodomínios das proteínas contêm múltiplas repetições do fator de crescimento epidermal EGF (do inglês, Epidermal Growth Factor). As repetições EGF sofrem modificações pós-traducionais por diversos glicanos que participam na estabilização da interação receptor-ligante. Juntamente com a região regulatória negativa NRR (do inglês, negative regulatory region), as repetições EGF compõem a parte extracelular NECD (do inglês, NOTCH Extracelular Domain) do receptor. Já na porção intracelular NICD (do inglês, NOTCH Intracelular Domain), se localizam: uma sequência RAM (do inglês, RBP-Jk-Associated Molecule), um domínio rico em prolina, glutamina, serina e treonina, chamado de PEST (do inglês, proline-P, glutamic acid-E, serine-S e threonine-T), além de repetições de anquirina ANK (do inglês, Ankyrin) responsáveis pela interação com fatores de transcrição no núcleo. As proteínas envolvidas neste complexo transcricional variam de acordo com a espécie estudada, sendo que nos humanos é representada pela CBF1/RBP-Jk, sendo referida como RBP-Jk nesta revisão. Além do NICD, se unem ao complexo

transcricional co-ativadores, como MAML, responsáveis pela transcrição dos genes-alvo de NOTCH (ARRUGA; VAISITTI; DEAGLIO, 2018; KUROOKA; KURODA; HONJO, 1998).

### 2.2.2. Ativação da via de sinalização NOTCH

Para a ativação da via canônica de sinalização NOTCH é necessário o contato físico do receptor NOTCH e seu ligante. Assim sendo, após a interação, o receptor NOTCH expresso na superfície celular sofre sucessivas clivagens proteolíticas e subsequente ativação transcricional, sendo a primeira clivagem dependente da endoprotease furina (clivagem S1) no NECD. Após isso, a metaloproteinase ADAM realiza uma segunda clivagem no NECD (clivagem S2), o que permite a facilitação da terceira clivagem (clivagem S3) e posterior liberação do NICD, realizada pelo complexo  $\gamma$ -secretase (HORI, 2013), processo representado na figura 4. Este complexo consiste em quatro proteases individuais: presenilina-1, nicastrina, Anterior-Pharynx-defective-1 e presenilina enhancer -2 (CAPACCIONA; PINE, 2013).

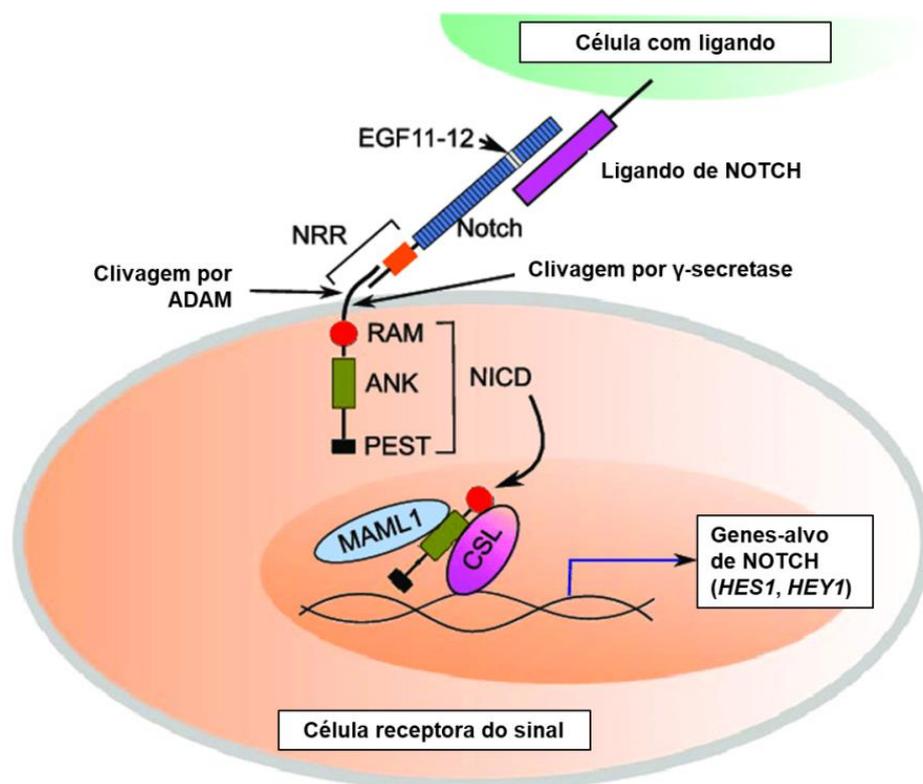


Figura 4: Via de sinalização NOTCH. Estrutura do receptor NOTCH, pontos de clivagem e mecanismo de ação através da interação com ligando de célula vizinha. Extraído e adaptado de: (ZHANG et al., 2016)

O NICD, resultado da clivagem, sofre translocação diretamente ao núcleo e comumente se associa ao complexo proteico RBP-Jk. Na ausência de NICD, o RBP-Jk se associa a um complexo de proteínas que atua como repressor transcricional. Ao contrário, se a porção NICD se liga ao mediador RBP-Jk, o fator de transcrição é convertido de um estado repressor a constitutivamente ativado através da dissociação do complexo SMRT/HDAC1 do RBP-Jk, o que permite a transcrição dos genes alvo de NOTCH (KOJIKI; GRIFFIN, 2001).

### 2.2.3 NOTCH no desenvolvimento, metabolismo e adipogênese

A sinalização NOTCH é notavelmente pleiotrópica e dificilmente existe um tecido que não seja afetado pelas escolhas do destino celular que são reguladas pela sinalização NOTCH. A consequência de desenvolvimento da regulação negativa ou positiva da sinalização NOTCH é estritamente específica ao contexto, e o mesmo sinal NOTCH pode, por exemplo, em um contexto promover a proliferação, enquanto em outro resultar em apoptose. Consequentemente, a maneira como a sinalização NOTCH é integrada a outras vias de sinalização no contexto de uma fisiologia celular específica, determina como a atividade NOTCH afeta o destino da célula. Apesar desta complexidade espacial e temporal, os eventos de especificação lateral são a marca registrada do destino da célula regulada por NOTCH (HORI; SEN; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2013).

Em geral, a ativação da via de sinalização NOTCH está associada a linhagens celulares precoces em desenvolvimento, tornando NOTCH um marcador muito bom para rastreamento de linhagem (FRE et al., 2011). A sinalização NOTCH tem sido implicada na regulação de um número crescente de células-tronco em muitos tecidos diferentes, fazendo com que seja caracterizada como uma "via de células-tronco" (LIU et al., 2010). É bom enfatizar que a atividade NOTCH é generalizada e importante para a diferenciação, manutenção e proliferação de células-tronco em quase todos os sistemas examinados, incluindo linhagens de células-tronco, intestinos, sistema hematopoiético, linha germinativa, vários epitélios,

músculos, mesênquima, sistema nervoso, adipócitos e outros (HORI; SEN; ARTAVANIS-TSAKONAS, 2013)

A sinalização NOTCH foi recentemente descrita como um elemento-chave no metabolismo, por ser um regulador chave do destino celular e celular e homeostase em praticamente todos os órgãos metabólicos. No fígado, a sinalização NOTCH estimula os programas de gliconeogênese e lipogênese, que levam à hiperglicemia e doença hepática gordurosa. No tecido adiposo, a ativação genética da sinalização NOTCH induz o clareamento do BAT e da resistência à insulina, enquanto a inibição genética ou farmacológica da sinalização NOTCH promove o escurecimento dos adipócitos brancos e melhora a sensibilidade à insulina (BI et al., 2014b).

No músculo esquelético e no cérebro, a ativação NOTCH reforça ativamente a quiescência das células-tronco adultas locais, portanto, limitando seus potenciais de reparo de tecido e, subsequentemente, influenciando o metabolismo do corpo. No sistema imunológico, a ativação da sinalização NOTCH promove a polarização do macrófago M1, produzindo um estado de inflamação sistêmica de baixo grau que exacerba a resistência à insulina nos tecidos periféricos. A inibição da sinalização NOTCH em vários desses tecidos melhora consistentemente a tolerância à glicose, a sensibilidade à insulina e melhora a obesidade e a aterosclerose (BI et al., 2014a).

O papel da via de NOTCH na adipogênese é controverso, e vários estudos afirmam que ela tem papel positivo no processo de diferenciação dos adipócitos, metabolismo energético e escurecimento dos adipócitos. Estudos demonstraram que a inibição ou deleção de *NOTCH1* reduz a massa WAT e aumenta a expressão de genes de assinatura BAT, promovendo a formação de adipócitos bege. Além disso, aumenta o gasto de energia, melhora a sensibilidade à insulina e protege os ratos da obesidade induzida por uma dieta rica em gordura (HFD) (BI et al., 2014a). Por outro lado, a ativação da sinalização de NOTCH1 em adipócitos é suficiente para promover um fenótipo de clareamento no tecido adiposo perivascular (BOUCHER et al., 2020). Recentemente, Vastrad et al. (2020) identificou *NOTCH1* como um gene diferencialmente expresso em análise in silico, sugerindo ser um gene chave na obesidade associada ao diabetes tipo 2.

Além disso, há evidências crescentes de interação entre a sinalização NOTCH1 e Wnt (relatada como desempenhando um papel fundamental na inibição da adipogênese) (ROSS; RAO; KADESCH, 2004). Isso é particularmente importante à luz das evidências que mostram que o knockdown de *NOTCH1* parece modular significativamente a via canônica Wnt /  $\beta$ -catenina pela redução da proteína GSK3 $\beta$  total expressa, e que, por sua vez, parece ser um regulador negativo do escurecimento nos adipócitos.

#### 2.2.4 Polimorfismos e mutações em *NOTCH1* e suas implicações

A sinalização NOTCH desregulada está ligada a várias doenças, incluindo o câncer. Em alguns casos, a doença é causada por mutações nos membros da via NOTCH, enquanto em outros casos o efeito é mais indireto, sendo observado como uma regulação aberrante na sinalização NOTCH (SIEBEL; LENDAHL, 2017).

Polimorfismos e mutações no gene *NOTCH1* são comumente encontrados em má-formações cardíacas, como a estenose da valva aórtica, coarctação da aorta e síndrome do coração esquerdo hipoplásico. McBride et al. (2008) descreve que as mutações em *NOTCH1* reduzem a sinalização através do ligante Jagged1, sendo que pequenas alterações na via podem provocar defeitos cardíacos. Além disso, diversos estudos associam polimorfismos em *NOTCH1* com outras doenças não-tumorais, como Diabetes tipo 1 (NYAGA et al., 2018), ansiedade e depressão (STEINE et al., 2016) e surdez (DING et al., 2018a).

No entanto, a grande maioria dos estudos que envolve mutações e polimorfismos de *NOTCH1* mostram sua associação com tumores. O polimorfismo rs3124591 aparece associado ao risco de desenvolvimento de cancer de mama (CAO et al., 2014), assim como o rs3124599 foi associado ao risco de câncer de pulmão em não fumantes (QUAN et al., 2017). Outros diversos trabalhos citam a presença de mutações de *NOTCH1* em tecidos tumorais.

No contexto da LLC, o proto-oncogene *NOTCH1* sofre mutação em aproximadamente 10% dos pacientes quando eles inicialmente requerem tratamento, mas isso aumenta para mais de 20% na recidiva e até 40% na transformação de Richter. Mutações de *NOTCH1* são essencialmente mutações truncadas dentro do exon 34 que resultam na perda do domínio PEST. Este domínio

é responsável pela instabilidade da proteína de tipo selvagem e sua perda demonstrou estabilizar as proteínas mutantes e, portanto, aumentar a sinalização de NOTCH. Uma deleção de frameshift [c.7544\_7545delCT (p.P2514 fs)] dentro do exon 34 foi relatada como responsável por até 90% das mutações de *NOTCH1* em CLL. Mutações não codificantes situadas na região 3' UTR de *NOTCH1* causam eventos de splicing aberrantes com um local doador de splice exônico críptico e resultam em uma deleção das últimas 158 bases de codificação do exon 34 e, da mesma forma, a perda do domínio PEST (PUENTE et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a variabilidade genética no gene *NOTCH1* está associada ao risco de sobrepeso/obesidade e resposta à curcumina na Leucemia Linfocítica Crônica

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se polimorfismos em *NOTCH1* estão associados ao sobrepeso / obesidade e outras variáveis clínicas associadas
- Realizar análise de associação regional, obtendo as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas
- Avaliar *in silico* a expressão gênica de células de LLC mutadas para *NOTCH1* e possíveis vias de sinalização como alvo
- Avaliar resposta à curcumina em células mutadas para o gene *NOTCH1* em cultura primária de LLC
- Avaliar resposta ao tratamento com a curcumina em modelo murino de LLC

## 4 MÉTODOS

### 4.1 ARTIGO 1 - ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS EM *NOTCH1* COM SOBREPESO E OBESIDADE EM UMA COORTE DE IDOSOS BRASILEIROS

#### 4.1.1 Coorte estudada

Todos os participantes (com 59 anos ou mais) eram independentes e selecionados no projeto interdisciplinar SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento - Saúde, Bem-Estar e Envelhecimento). O SABE foi coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS / OMS) como uma pesquisa multicêntrica de saúde e bem-estar de pessoas idosas em sete centros urbanos do Caribe e da América Latina, incluindo São Paulo - Brasil. O projeto SABE foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (CAAE: 47683115.4.0000.5421, Revisão: 3.600.782). A coleta contém todos os conjuntos de dados genômicos de nível individual que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo CEP / CONEP (Comitês de Ética locais e nacionais). A aprovação da ética foi dada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil (número de protocolo 2015/12837 / 1.015.223). Desde então, esta coorte foi analisada em estudos genéticos (BRIDE et al., 2021; NASLAVSKY et al., 2017, 2020).

#### 4.1.2 Dados bioquímicos e antropométricos

A coleta de dados foi realizada por equipe treinada e descrita em outro lugar (NASLAVSKY et al., 2020). Um questionário padronizado (C10) com foco na história médica, estilo de vida e características sociodemográficas foi coletado de todos os indivíduos. O C10, proposto pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foi traduzido e adaptado para uso na coorte brasileira. O DM2, hipertensão e tabagismo foram autorreferidos. Todos os participantes foram submetidos à punção venosa de sangue para análises bioquímicas e genômicas.

As seguintes variáveis demográficas e de saúde foram registradas: sexo, idade, pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), colesterol HDL (mg / dL), colesterol LDL (mg / dL), total colesterol (TC) (mg

/ dL), triglicerídeo em jejum (TG) (mg / dL), glicose plasmática em jejum (FPG) (mg / dL), hemoglobina glicada (Hb1Ac) (%), proteína C reativa (hsCRP) ( mg / L), IMC (kg / m<sup>2</sup>) e Circunferência da Cintura (CC) (cm). O peso e a altura foram medidos em balança portátil (Seca, Alemanha) e antropômetro (Harpenden, Inglaterra), respectivamente. A CC foi medida a meio caminho entre a margem inferior da última costela palpável e o topo da crista ilíaca usando uma fita métrica inelástica, com aproximação de 0,1 cm após a inspiração e expiração. O IMC foi calculado com o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg / m<sup>2</sup>).

Utilizando a classificação da OMS (WHO, [s.d.]), dividimos os indivíduos em grupos de acordo com os valores de IMC em sobrepeso / obesidade ( $\geq 25,0$  kg / m<sup>2</sup>, excesso de peso) e peso normal ( $\leq 24,9$  kg / m<sup>2</sup>). Após a exclusão dos indivíduos com dados incompletos ou que não realizaram o teste genético, foram incluídos no presente estudo 1.024 idosos.

#### **4.1.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e Seleção de Tag SNPs**

A extração do DNA, o sequenciamento do genoma completo e o controle de qualidade das variantes foram seguidos conforme descrito em outro lugar (NASLAVSKY et al., 2020). As frequências dos alelos foram depositadas no ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações (Arquivo Online de Mutações Brasileiras, <http://abraom.ib.usp.br>). Usamos as ancestrais individuais europeias, africanas, americanas nativas e do leste asiático inferidas por Naslavsky et al. (2020) como covariáveis em nossos modelos.

Filtramos SNPs localizados nas posições inicial e final de *NOTCH1* mais 50-Kb em ambos os lados, abrangendo Chr9: 136440101 a 136599978 da sequência de referência humana (GRCh38: NC\_000009.12). Após a exclusão dos INDELS, primeiro retivemos SNPs com Frequência Alélica Menor (MAF)  $\geq 0,01$  e em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $P > 0,05$ ). Em seguida, SNPs foram selecionados usando uma abordagem de tag SNP (algoritmo de tagging pairwise realizado com limiar de  $r^2 \geq 0,8$ ) usando dados de genótipo HapMap (versão 28) no software Haploview 4.2 (BARRETT et al., 2005). Tag SNPs foram incluídos na análise de associação. As frequências de alelos e genótipos de SNPs associados foram comparadas com o projeto Allele Frequency Aggregator (ALFA) do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (PHAN et al., 2020).

#### 4.1.4 Análises estatísticas

As características dos indivíduos foram comparadas por meio de estatística descritiva. As variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e porcentagens, N (%), e as variáveis contínuas foram expressas como mediana e valores extremos (mínimo e máximo) para dados não paramétricos. O teste de Kolmogorov-Smirnov para uma amostra foi usado para testar a normalidade da distribuição. As comparações entre indivíduos com sobrepeso/obesidade e eutróficos foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado e do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A análise de associação baseada em SNP foi realizada usando o pacote R “SNPassoc”, sob diferentes modelos genéticos (codominante, dominante, recessivo, overdominant e log-aditivo) (GONZÁLEZ et al., 2007). A análise foi ajustada para idade, sexo e ancestralidade (Modelo 1) e para todas as variáveis de confusão (Modelo 2). Odds ratios (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados por regressão logística multinomial. Blocos de haplótipos foram definidos com base em Gabriel et al. (2002) e gráficos de desequilíbrio de ligação (LD) foram gerados usando Haploview 4.2.31. As frequências de haplótipos foram estimadas pelo algoritmo Expectation - Maximization (algoritmo EM) usando o pacote estatístico R “HaploStats” (SCHAID et al., 2002).

Adotamos significância de  $P < 0,05$  e correção de Bonferroni para comparações de testes múltiplos ( $P = 0,05 / N$  de SNPs de tag ou  $N$  de haplótipos testados) ou quando necessário. A análise estatística foi realizada no SPSS versão 27.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) e no ambiente computacional R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020).

#### 4.1.5 Análises *In Silico*

A anotação funcional dos SNPs associados foi obtida nos sites de previsão funcional: rVarBase (GUO et al., 2016), HaploReg (WARD; KELLIS, 2016), RegulomeDB (BOYLE et al., 2012), e portal Gtex (ARDLIE et al., 2015). O banco de dados rVarBase (versão 2.0 do rSNPBase) foi usado para descrever as características regulatórias do SNP na dimensão de estados de cromatina,

elementos regulatórios sobrepostos e genes alvo potenciais (GUO et al., 2016). HaploReg v4.1 (WARD; KELLIS, 2016) e RegulomeDB (BOYLE et al., 2012) foram usados para anotar os SNPs por mineração sistemática de dados comparativos, regulatórios e epigenômicos, com base no projeto Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). A pontuação RegulomeDB foi usada para identificar e comparar variantes regulatórias potenciais; pontuações mais baixas estão associadas a uma gama mais ampla de dados que sustentam a importância funcional. O portal GTEx (Genotype-Tissue Expression) (ARDLIE et al., 2015) foi usado para determinar a expressão significativa de loci de traços quantitativos (eQTL) para os SNPs associados.

## 4.2 ARTIGO 2 – RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

### 4.2.1 Fonte De Dados, Pré-Processamento e Análise Diferencial

Os dados de expressão gênica foram obtidos do banco de dados público do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia GEO (Barrett, T. et al., 2013) com o número de acesso GSE131114, GSE75122 e GSE92626. Neste estudo, selecionamos 52 amostras; incluindo 21 amostras de CLL com mutação de *NOTCH1* e 31 amostras de *NOTCH1* WT CLL. Para manter a consistência ao longo do estudo, foram excluídas séries de amostras para ICN1 negativo ou mutações em outros genes. Dados de microarray normalizados foram transformados em log<sub>2</sub> e fragmentos normalizados por quilobase de modelo de exon por milhão de leituras mapeadas (FPKM) contendo valores de dados de RNA-Seq foram transformados seguindo Mooney et al. (2013). Os dados RNA-Seq transformados foram combinados com conjuntos de dados de microarray com ID Entrez exclusivo. A função Combat do pacote SVA R (LEEK; JOHNSON, 2012) foi usada para ajustar os efeitos de lote conhecidos de conjuntos de dados combinados de diferentes GSEs. A análise do Rank Product foi usada para calcular os valores do Rank Product (RP) que foram baseados na mudança de dobra (FC) do rank usando o pacote RankProd R (Hong, 2006). A taxa de descoberta falsa (FDR) usando o método Benjamini-Hochberg (BH) foi controlada em 0,01, abaixo da qual todos os genes foram extraídos representando listas de genes DE para cada comparação de dados de

microarray e RNA-Seq. Como o produto de classificação é um método baseado em classificação e os valores de FC eram heterogêneos, um valor de FC maior do que 1 foi identificado como genes DE regulados positivamente e menos de 1 identificado como genes DE regulados negativamente. O teste de correlação de pares de logFC dos genes DE para as duas comparações dentro e entre as duas tecnologias foi realizado usando o teste de correlação de “Spearman” na base R.

#### **4.2.2 Ontologia genética (GO) e análise de enriquecimento de vias**

Para realizar a análise funcional da lista de genes resultante com o Gene Ontology (GO), as anotações foram realizadas usando o pacote clusterProfiler do Bioconductor em R (Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q. -Y., 2012). O enriquecimento funcional foi realizado para cada comparação contra as três categorias GO (BP, CC e MF). Genoma de anotação ampla, com base no mapeamento usando Entrez Gene Identifiers (“org.Hs.eg.db”), o método do valor p ajustado foi Benjamini e Hochberg (BH), e os pontos de corte para os valores p e q foram definidos como 0,05 . Os termos GO redundantes foram eliminados usando a função “simplificar” do pacote clusterProfiler. O último pacote também foi usado para visualizar algumas categorias e genes GO usando um gráfico de mapa de calor (heatmap) e uma rede circular (cnetplot). O enriquecimento da via da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) também foi realizado.

#### **4.2.3 Análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA)**

A análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA) foi realizada usando o método pré-classificado na implementação GSEA Java. A lista de genes, organizada por escores z em ordem decrescente, foi usada como conjuntos de genes pré-classificados e convertidos para o formato de lista de classificação de acordo com Jung et al. (Jung et al., 2018). Genes Hallmark do banco de dados de assinaturas moleculares (MsigDB, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) foram usados como conjuntos de genes (Liberzon et al., 2015).

#### 4.2.4 Isolamento de células de LLC

Amostras de sangue periférico (PB) foram obtidas de pacientes com LLC não tratados. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque e aprovados pelo Comitê de Revisão Institucional da Universidade de Perugia. As características do paciente são descritas na Tabela Suplementar S1. As células CLL foram isoladas de sangue total usando centrifugação em gradiente de densidade Ficoll seguida por rosetagem de eritrócitos de ovelha. Resumidamente, este procedimento permitiu a separação de células leucêmicas B não rosetadas altamente purificadas ( $93,8 \pm 2,7\%$  CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup>) de células T rosetadas. A pureza das células foi avaliada por análise de citometria de fluxo (EPICS-XLMCL; Beckman Coulter, Fullerton, CA) usando anticorpos monoclonais anti CD45, CD19, CD5, CD11b, CD3 (mAb) em 7AAD negativo (todos da Beckman Coulter). Os casos de LLC foram caracterizados quanto ao status mutacional IGHV, SF3B1 e MYD88, as principais anormalidades citogenéticas descritas (DÖHNER et al., 2000; GHIA et al., 2007; PATNAIK et al., 2012).

#### 4.2.5 Status mutacional de *NOTCH1*

A carga alélica de *NOTCH1* em células de LLC foi determinada por PCR específico de alelo (AS-PCR) e PCR digital (ddPCR) conforme descrito anteriormente (DI IANNI et al., 2018).

#### 4.2.6 Cultura de células e tratamento com a curcumina

Células de LLC colhidas a fresco ou congeladas de forma viável foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% ou 20% de soro humano inativado por calor (FBS, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), L-glutamina 2mM e 100U / ml penicilina / 100µg / ml estreptomicina a 37 ° C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Para ativar especificamente a sinalização de NOTCH1, 2x10<sup>6</sup> células / ml foram tratadas com EDTA 0,5 mM por 1 h. As células de LLC foram tratadas com veículo (dimetilsulfóxido) ou curcumina (Sigma-Aldrich) adicionado diretamente ao meio em diferentes momentos.

#### **4.2.7 Análise de citometria de fluxo**

As células apoptóticas foram enumeradas por citometria de fluxo em um analisador FACSCalibur (BD Biosciences) após coloração com Anexina-V-APC / Iodeto de Propídio (Immunotech, Beckman Coulter) realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis (AnV- / PI-) ou apoptóticas (An + / PI- ou AnV + / PI +) em relação ao controle tratado com veículo. A medição do fluxo de  $Ca^{2+}$  foi realizada usando o kit de ensaio de cálcio Fluo-4 Direct™ (Life technologies, Thermo Scientific, Eugene, Oregon, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A análise dos dados foi realizada com o software FlowJo versão 10 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, EUA).

#### **4.2.8 Western blotting**

A análise de Western blot foi conduzida com protocolos previamente relatados. Em resumo, em cada ponto de tempo, as células foram coletadas e lavadas com PBS. As proteínas de células inteiras foram extraídas por tampão de lise RIPA frio contendo coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford e fracionada por SDS-PAGE e eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose (Millipore). Os blots foram bloqueados e incubados com anticorpos primários durante a noite a 4°C, e então visualizados com substrato quimioluminescente Supersignal (Thermo Fisher Scientific) em filme de raios-X. A quantificação densitométrica da intensidade do sinal em relação ao controle de carregamento GAPDH foi realizada usando o software Quantity One.

#### **4.2.9 Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR)**

O RNA total foi extraído das células usando RNeasy Micro Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Um kit PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Biotechnology Co., Ltd.) foi usado para sintetizar cDNA conforme as instruções do fabricante e RT-PCR foi realizado com PCR Master Mix Power SYBER Green (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido) usando o 7900HT fast Sistema PCR em tempo real

(Biosistema Aplicado). Os níveis de expressão relativa do mRNA foram calculados usando o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  e normalizados para GAPDH.

#### **4.2.10 Modelo de mouse Eu-TCL1**

Os camundongos foram mantidos em condições específicas livres de patógenos e os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê Universitário para o Cuidado Ético e Uso de Animais em Experimentos. Camundongos E $\mu$ -TCL1 mais velhos (8 meses de idade, CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> (%) periférico =  $5 \pm 3,25$ ) com alta carga de CLL no sangue periférico foram identificados examinando a porcentagem de células CLL em PBMCs. Estes camundongos foram tratados diariamente por 8 semanas com curcumina (50 mg / kg) administrada diariamente por injeção intra-peritoneal. O grupo de controle recebeu i.p. injeções com óleo de milho (Sigma-Aldrich), usado como veículo. O desenvolvimento de LLC foi seguido por hemograma completo e medições de citometria de fluxo no sangue periférico com sangramentos mensais. No sacrifício, o peso do rato e o tamanho do baço foram medidos. Sangue periférico, medula óssea, baço, fígado e gânglios linfáticos foram analisados por citometria de fluxo. Os lisados do baço e da medula óssea foram analisados em western blotting. O baço inteiro do veículo e dos camundongos tratados foi injetado em camundongos C57BL / 6 imunocompetentes e eles foram monitorados para CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> (%) periférico por citometria de fluxo e taxa de sobrevivência. A sobrevivência geral dos animais foi estimada pela análise de Kaplan-Meier.

#### **4.2.11 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP e as diferenças estatísticas entre os valores médios foram avaliadas usando testes não paramétricos como Wilcoxon para dados pareados e Mann-Whitney para dados não pareados. Os resultados foram indicados como significativos e marcados da seguinte forma: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ARTIGO SUBMETIDO: Associação de variantes genéticas em *NOTCH1* com sobrepeso e obesidade em uma coorte de idosos brasileiros

Artigo referente ao estudo de associação de tag SNPs e haplótipos do gene *NOTCH1* com sobrepeso e obesidade na coorte de idosos do projeto SABE. O referido artigo está foi submetido para a revista *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Qualis A1 - Biotecnologia), tendo o estudante de doutorado Estevão Carlos Silva Barcelos como primeiro autor. Segue a partir da próxima página o artigo na íntegra juntamente com material suplementar.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

**ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS EM *NOTCH1* COM SOBREPESO E  
OBESIDADE EM UMA COORTE DE IDOSOS BRASILEIROS**

**VITÓRIA**  
**2021**

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS

ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS EM *NOTCH1* COM SOBREPESO E  
OBESIDADE EM UMA COORTE DE IDOSOS BRASILEIROS

Artigo adicionado à tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA  
2021

## **Associação de variantes genéticas em *NOTCH1* com sobrepeso e obesidade em uma coorte de idosos brasileiros**

Estevão Carlos Silva Barcelos<sup>1</sup>, Michel Naslavsky<sup>2</sup>, Izadora Silveira Fernandes<sup>1</sup>, Marília Scliar<sup>2</sup>, Guilherme Lopes Yamamoto<sup>2</sup>, Jaqueline Wang<sup>2</sup>, Lais Bride<sup>1</sup>, Valdemir Pereira de Sousa<sup>1</sup>, Lucia HS Pimassoni<sup>3</sup>, Paolo Sportoletti<sup>4</sup>, Flavia de Paula<sup>1,5</sup>, Sandra Ventorin von Zeidler<sup>1</sup>, Yeda Duarte<sup>6,7</sup>, Maria Rita Passos Bueno<sup>2</sup>, Mayana Zatz<sup>2</sup>, Flávia Imbroisi Valle Errera<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup> Escola de Ciências Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, Espírito Santo, Brasil

<sup>4</sup> Instituto de Hematologia - Centro di Ricerca Emato-Oncologica (CREO), Departamento de Medicina e Cirurgia, Universidade de Perugia, Perugia, Itália.

<sup>5</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil

<sup>6</sup> Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>7</sup> Escola de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

### **RESUMO**

**Introdução:** O sobrepeso e a obesidade são distúrbios comuns que envolvem fatores genéticos e ambientais, associados a doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e outros. *NOTCH1* é fundamental para a manutenção de células-tronco e tecidos adultos, sendo relatado como um jogador-chave na adipogênese.

**Objetivo:** Investigamos se os polimorfismos de nucleotídeo único *NOTCH1* (SNPs) estão associados ao sobrepeso / obesidade em uma coorte brasileira. Dados antropométricos, bioquímicos, histórico médico e estilo de vida foram coletados.

**Métodos:** Foram analisados dados de sequenciamento de 1.024 indivíduos (com idade entre 59 e 99 anos): 424 apresentavam sobrepeso, 320 obesidade e 280 eram eutróficos. Analisamos cento e sessenta e um tag SNPs abrangendo todo o gene *NOTCH1* e fronteiras através da abordagem de marcação SNP (frequência de alelo menor $\geq$ 0,01 e desequilíbrio de ligação em pares  $r^2\geq$ 0,8).

**Resultados:** Observamos associação do SNP rs9411207 com o risco de sobrepeso / obesidade, sob o modelo aditivo, e a distribuição dos genótipos mostrou aumento da frequência de TT homozigoto (OR = 1,50, IC 95%: 1,20-1,88;  $P = 0,0002$ ) O

haplótipo GAT construído a partir deste e de outros SNPs em alto Linkage Disequilibrium foi mais frequente em indivíduos com sobrepeso / obesidade ( $P = 0,003$ ). A análise *In silico* sugeriu que esses SNPs provavelmente afetam a transcrição de *NOTCH1* e outros genes.

Conclusão e perspectivas: Este é o primeiro estudo relatando associação entre SNPs de *NOTCH1* e risco de sobrepeso / obesidade. Considerando a possibilidade de modulação *NOTCH1*, estudos populacionais adicionais são necessários para replicar esses resultados e confirmar a utilidade desses genótipos de risco para novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Idoso, Haplótipo, gene *NOTCH1*, Peso excessivo, Polimorfismo de nucleotídeo único

## **INTRODUÇÃO**

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a frequência de pessoas com Índice de Massa Corporal (IMC) elevado está aumentando rapidamente em todo o mundo (KALISH, 2016; SARMA; SOCKALINGAM; DASH, 2021). A obesidade deve afetar 50-60% da população adulta até 2050 (AGHA; AGHA, 2017). Paralelamente a esse aumento, cresce a proporção da população acima de 65 anos e, conseqüentemente, a alta prevalência de obesos e idosos (DHANA et al., 2016). Essas condições estão associadas a um maior risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 (T2D) e muitas outras condições crônicas (POWELL-WILEY et al., 2021).

O sobrepeso e a obesidade (excesso de peso) consistem em um distúrbio multifatorial caracterizado por células de gordura anormais ou excessivas em depósitos específicos no corpo. O tecido adiposo é composto por tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT). O WAT armazena o excesso de energia como triglicerídeos; O BAT é especializado em termogênese e recentemente apontado como um regulador do metabolismo sistêmico (YUKO; SAITO, 2021). Além disso, os adipócitos bege, uma subpopulação de progenitores no WAT, têm uma capacidade termogênica altamente induzível mediante estimulação (WU et al., 2012).

O sobrepeso e a obesidade são geneticamente complexos resultantes da interação entre um perfil genético de risco e fatores ambientais (GHOSH; BOUCHARD, 2017). O componente genético da obesidade é responsável por 40% a 50% da variabilidade no status do peso corporal, mas varia entre as classes de IMC, sendo menor entre indivíduos com peso normal (~30%) e maior em indivíduos com obesidade leve a grave (60% -80%). Dois terços da herdabilidade do IMC podem ser atribuídos a variantes comuns de DNA, enquanto as variantes raras e de baixa frequência explicam a fração restante (BOUCHARD, 2021). Os alelos promotores da obesidade exercem efeitos mínimos em indivíduos com peso normal, mas podem ter maior penetrância em indivíduos com tendência à obesidade (BOUCHARD, 2021).

Muitos estudos de associação do genoma (GWAS) detectaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados a IMC elevado, por exemplo, aqueles dentro do gene *FTO* (SCUTERI et al., 2007; TM et al., 2007). No entanto, uma das principais preocupações é que GWAS acabará por implicar todo o genoma na predisposição de doenças e que a maioria dos sinais de associação refletem variantes e genes sem relevância biológica direta para doenças e características (TAM et al., 2019). Neste contexto, a abordagem do gene candidato oferece a possibilidade de priorizando genes e vias altamente relevantes, aumentando o poder estatístico para detectar diferenças (ALGHAMDI; PADMANABHAN, 2014).

A sinalização NOTCH é uma via conservada que regula a proliferação celular, diferenciação, potencial de autorrenovação, apoptose, resposta inflamatória e decisões de destino celular (PAKVASA et al., 2021; PERDIGOTO; BARDIN, 2013). Esta via complexa envolve quatro receptores NOTCH, codificado por genes *NOTCH1-4* e cinco ligantes das famílias Jagged / Delta-like (Jagged1/2, Dll1/3/4) (MATSUNO, 2020). *NOTCH1* foi destacado em experimentos *in vitro* e em camundongos como um regulador do metabolismo, diferenciação de adipócitos, adipogênese e escurecimento dos adipócitos. Além disso, camundongos mutantes *NOTCH1* são resistentes à obesidade induzida por dieta rica em gordura (BARTOLOME et al., 2019; BI et al., 2014; LIU; LOGAN; NEWMAN, 2020).

O gene *NOTCH1* (9q34) é composto por 34 exons e expresso em células-tronco e na maioria dos tecidos adultos. Modificações crípticas na mesma localização genômica são conhecidas por causar obesidade e síndromes de retardo mental

(CORMIER-DAIRE et al., 2003; D'ANGELO et al., 2018; GAWLIK-KUKLINSKA et al., 2007). Os SNPs de *NOTCH1* foram identificados em malformações cardiovasculares (PILEGGI et al., 2019), condições de estresse no início da vida (STEINE et al., 2016), susceptibilidade a doenças de estilo de vida (DING et al., 2018) e câncer (SHAH et al., 2020), mas sobrepeso e obesidade não foram explorados. Assim, considerando as evidências experimentais acima de envolvimento de *NOTCH1* no metabolismo e adipogênese, hipotetizamos que variações genéticas em *NOTCH1* estão associadas ao fenótipo de peso excessivo. Portanto, nosso principal objetivo é verificar se as variações genéticas no *NOTCH1* estão associadas ao sobrepeso /obesidade e características relacionadas.

## **MÉTODOS**

### **Coorte de estudo**

Todas as amostras dos participantes (com 59 anos ou mais) eram independentes e selecionadas pelo projeto interdisciplinar SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento - Saúde, Bem-Estar e Envelhecimento). O SABE foi coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS / OMS) como uma pesquisa multicêntrica de saúde e bem-estar de idosos em sete centros urbanos do Caribe e da América Latina, incluindo São Paulo - Brasil. O projeto SABE foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (CAAE: 47683115.4.0000.5421, Revisão: 3.600.782). A coleta contém todos os conjuntos de dados genômicos de nível individual que concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo CEP / CONEP (Comitês de Ética locais e nacionais). A aprovação da ética foi dada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil (número de protocolo 2015/12837 / 1.015.223). Desde então, esta coorte foi analisada em estudos genéticos (BRIDE et al., 2021; NASLAVSKY et al., 2017, 2020).

### **Coleção de dados**

A coleta de dados foi realizada por equipe treinada e descrita em outro local (NASLAVSKY et al., 2020). Um questionário padronizado (C10) com foco na história médica, estilo de vida e características sociodemográficas foi coletado de todos os

indivíduos. O C10, proposto pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foi traduzido e adaptado para uso na coorte brasileira. O DM2, hipertensão e tabagismo foram autorreferidos. Todos os participantes foram submetidos à punção venosa de sangue para análises bioquímicas e genômicas.

As seguintes variáveis demográficas e de saúde foram registradas: sexo, idade, pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), colesterol HDL (mg / dL), colesterol LDL (mg / dL), total colesterol (CT) (mg / dL), triglicerídeo em jejum (TG) (mg / dL), glicose plasmática em jejum (FPG) (mg / dL), hemoglobina glicada (Hb1Ac) (%), proteína C reativa (hsCRP) ( mg / L), IMC (kg / m<sup>2</sup>) e Circunferência da Cintura (CC) (cm). O peso e a altura foram medidos em balança portátil (Seca, Alemanha) e antropômetro (Harpenden, Inglaterra), respectivamente. A CC foi medida a meio caminho entre a margem inferior da última costela palpável e o topo da crista ilíaca usando uma fita métrica inelástica, com aproximação de 0,1 cm após a inspiração e expiração. O IMC foi calculado com o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros (kg / m<sup>2</sup>).

Usando a classificação da OMS, ("Obesity and overweight", 2021) dividimos os indivíduos em grupos de acordo com os valores de IMC em sobrepeso / obesidade ( $\geq 25,0$  kg / m<sup>2</sup>, excesso de peso) e peso normal ( $\leq 24,9$  kg / m<sup>2</sup>). Após a exclusão dos indivíduos com dados incompletos ou que não realizaram o teste genético, um total de 1.024 idosos foram incluídos no presente estudo.

### **Dados de sequenciamento de próxima geração e seleção de tag SNPs**

Extração de DNA, sequenciamento do genoma completo e controle de qualidade de variantes foram seguidos conforme descrito em outro lugar (NASLAVSKY et al., 2020). As frequências alélicas foram depositadas no ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações (Arquivo Online de Mutações Brasileiras, [http:// abraom .ib.usp.br](http://abraom.ib.usp.br)). Usamos as ancestrais individuais europeias, africanas, americanas nativas e do leste asiático inferidas por Naslavsky et al. (2020) como covariáveis em nossos modelos. Filtramos SNPs localizados nas posições inicial e final de *NOTCH1* mais 50-Kb em ambos os lados, abrangendo Chr9: 136440101 a 136599978 da sequência de referência humana (GRCh38: NC\_000009.12). Após a exclusão dos INDELS, primeiro retivemos SNPs com Frequência Alélica Menor (MAF)  $\geq 0,01$  e em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $P > 0,05$ ). Em seguida, os SNPs foram

selecionados usando uma abordagem de tag SNP (algoritmo de tagging pairwise realizado com limiar de  $r^2 \geq 0,8$ ) usando dados de genótipo HapMap (versão 28) no software Haploview 4.2. (BARRETT et al., 2005) Tag SNPs foram incluídos na associação análise. As frequências de alelos e genótipos de SNPs associados foram comparadas com o projeto Allele Frequency Aggregator (ALFA) do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (PHAN et al., 2020).

### **Análise estatística**

As características dos indivíduos foram comparadas por meio de estatística descritiva. As variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e porcentagens, N (%), e as variáveis contínuas foram expressas como mediana e valores extremos (mínimo e máximo) para dados não paramétricos. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para testar a normalidade da distribuição. As comparações entre indivíduos com sobrepeso / obesidade e peso normal foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado e do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A análise de associação baseada em SNP foi realizada usando o pacote R “SNPassoc”, sob diferentes modelos genéticos (codominante, dominante, recessivo, overdominante e log-aditivo) (GONZÁLEZ et al., 2007). A análise foi ajustada para idade, sexo e ancestralidade (Modelo 1) e para todas as variáveis de confusão (Modelo 2). Odds ratios (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados por regressão logística multinomial. Blocos de haplótipos foram definidos com base em Gabriel et al (GABRIEL et al., 2002) e gráficos de desequilíbrio de ligação (LD) foram gerados usando Haploview 4.2 (BARRETT et al., 2005). As frequências de haplótipos foram estimadas pelo algoritmo de Expectativa - Maximização (algoritmo EM ) usando o pacote estatístico R “HaploStats” (SCHAID et al., 2002).

Adotamos significância de  $P < 0,05$  e correção de Bonferroni para comparações de testes múltiplos ( $P = 0,05 / N$  de tag SNPs ou  $N$  de haplótipos testados) ou quando necessário. A análise estatística foi realizada no SPSS versão 27.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) e no ambiente computacional R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020).

### **Análise funcional *In silico***

A anotação funcional dos SNPs associados foi obtida nos sites de previsão funcional: rVarBase, (GUO et al., 2016) HaploReg, (WARD; KELLIS, 2016) RegulomeDB, (BOYLE et al., 2012) e portal Gtex (ARDLIE et al., 2015). O banco de dados rVarBase (versão 2.0 de rSNPBase) foi usado para descrever as características regulatórias do SNP na dimensão dos estados de cromatina, elementos regulatórios sobrepostos e genes alvo potenciais (GUO et al., 2016). HaploReg v4.1 (WARD; KELLIS, 2016) e RegulomeDB (BOYLE et al., 2012) foram usados para anotar os SNPs por mineração sistemática de dados comparativos, regulatórios e epigenômicos, com base no projeto Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE). A pontuação RegulomeDB foi usada para identificar e comparar variantes regulatórias potenciais; pontuações mais baixas estão associadas a uma gama mais ampla de dados que sustentam a importância funcional. O portal GTEx (Genotype-Tissue Expression) (ARDLIE et al., 2015) foi usado para determinar a expressão significativa de loci de traços quantitativos (eQTL) para os SNPs associados.

## **RESULTADOS**

### **Coorte de estudo**

Do total de indivíduos com dados de fenótipo e genótipo (N = 1.024), 424 apresentavam sobrepeso (41,4%), 320 obesidade (31,25%) e 280 eram eutróficos (27,34%). A mediana de idade foi de 71,31 anos (variação de 59 a 99 anos) e 64,28% eram mulheres. As características clínicas, antropométricas e sociodemográficas dos indivíduos, bem como as frequências de ancestrais europeus, africanos, nativos e asiáticos, foram apresentadas na Tabela 1. Indivíduos com sobrepeso / obesidade apresentaram valores aumentados de PAD e prevalência de hipertensão, mesmo como FPG, Hb1Ac, hsCRP, níveis de TG, em comparação com o peso normal ( $P < 0,001$ ). Níveis diminuídos de colesterol HDL foram observados em indivíduos com sobrepeso / obesidade ( $P < 0,001$ ). O sobrepeso / obesidade foi menos frequente em indivíduos fumantes ( $P < 0,001$ ) e ex-fumantes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1 – Características clínicas, antropométricas e sócio-demográficas da coorte SABE

Variáveis	Todos os indivíduos	Peso normal	Sobrepeso/Obesidade	P-valor
<i>N</i>	1024	280 (27.34%)	744 (72.65%)	—
Homens/Mulheres(%)	365(35.71%)/657(64.28%)	115(41.21%)/164(58.78%)	250(33.64%)/493(66.35%)	0.024
Idade (anos)	71.31(59-99)	74.36(60-99)	68.97(59-98)	<0.001
<i>Freq. Ancestralidade</i>				
Européia	72.53%	72.08%	72.69%	0.79
Africana	17.89%	16.13%	18.55%	0.04
Asiática	2.80%	5.26%	1.88%	0.22
Nativo-americana	6.75%	6.49%	6.85%	0.82
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.45(15.13-53.61)	22.83(15.13-25)	29.2(25.01-53.61)	<0.001
CC (cm)	94(62-142)	82(64-99)	98(62-142)	<0.001
Hipertensão (%)	702(68.55%)	167(59.64%)	535(71.9%)	<0.001
PAS (mmHg)	138(88-250)	135(88-242)	138.5(91-250)	0.13
PAD (mmHg)	79(49-125)	76(50-117)	80(49-125)	<0.001
HDL (mg/dl)	48(19-133)	52(20-124)	46(19-133)	<0.001
LDL (mg/dl)	126(28-299)	126(41-226)	125(28-299)	0.89
CT (mg/dl)	204(86-388)	204(89-321)	204(86-388)	0.94
TG (mg/dl)	115(25-1283)	101(25-436)	121.5(34-1283)	<0.001
T2D (%)	259 (25.29%)	53 (18.92%)	206 (27.68%)	0.004
FPG (mg/dl)	88(80-102)	85(78-95)	90(82-105.8)	<0.001
Hb1Ac (%)	5.8(4.8-13.7)	5.7(4.9-13.6)	5.8(4.8-13.7)	<0.001
hsCRP (mg/L)	2.34(0.14-141)	1.43(0.14-61.5)	2.83(0.14-141)	<0.001
Ex/fumante atual	375(36.62%)/121(11.81%)	110(39.28%)/52(18.57%)	265(35.61%)/69(9.27%)	<0.001

Resultados são apresentados como medianas e valores extremos (mínimo e máximo). P-valores indicam diferenças entre indivíduos com peso normal (IMC < 25Kg/m<sup>2</sup>) e sobrepeso/obesidade (IMC ≥ 25kg/m<sup>2</sup>) de acordo com o teste de Mann-Whitney para variáveis não-paramétricas e o teste do qui-quadrado para as variáveis sexo e fumo. Frequências de ancestralidade foram expressas como porcentagens dos valores médios. Números em negrito mostram valores com significância estatística (P < 0,05). Abreviações: IMC, Índice de massa corpórea; CC, Circunferência da cintura; PAS, Pressão Arterial Sistólica; PAD, Pressão Arterial Diastólica; HDL, Lipoproteína de alta densidade; LD, Lipoproteína de baixa densidade; CT, Colesterol total; TG, triglicérides; T2D, Diabetes tipo 2; FPG: Glicose em jejum; Hb1Ac: Hemoglobina glicada; hsCRP: Proteína C reativa.

## Associação de SNPs individuais com sobrepeso / obesidade

De um total de 3816 SNPs na região e bordas de *NOTCH1* (*SEC16A*, *C9orf163* e *NALT1*), 566 eram pouco frequentes ou comuns, dos quais 453 se encontravam em HWE. Destes, 161 tag SNPs foram incluídos na análise de associação (Tabela 1 suplementar). Após ajuste para idade, sexo e ancestralidade (Modelo 1), observamos associação entre o SNP rs9411207 e sobrepeso / obesidade. Usando o Critério de Informação de Akaike, o modelo aditivo para este SNP melhor se ajusta aos dados (OR = 1,49; IC 95% = 1,21-1,85;  $P = 0,0002$ ), sobrevivendo à correção de Bonferroni [ $P \leq 0,0003$  (0,05 / 161)]. Observamos também, no modelo aditivo, uma associação sugestiva entre os SNPs rs2229971 (OR = 1,46; IC 95% = 1,17-1,81;  $P = 0,0005$ ), rs11574891 (OR = 1,43; IC 95% = 1,15-1,77;  $P = 0,0012$ ), rs3125005 (OR = 1,36; IC 95% = 1,10-1,67;  $P = 0,0038$ ), rs3812604 (OR = 1,35; IC 95% = 1,10-1,65;  $P = 0,0041$ ) e sobrepeso / obesidade (Tabela suplementar 2).

Todos esses SNPs foram encontrados no gene *NOTCH1*. A frequência mundial para o alelo T de rs9411207 está em torno de 0,35 (projeto ALFA), e em nossa coorte variou de 0,36 a 0,43 entre os grupos. Outras variantes analisadas também apresentaram frequências semelhantes ao projeto ALFA (Tabela Suplementar 3). A distribuição dos genótipos para rs9411207 variou para ancestrais, LDL e FPG. Entre os SNPs marginalmente associados, a distribuição dos genótipos também diferiu de acordo com as variáveis (Tabela Suplementar 4). Em relação à antropometria, o genótipo AA de rs11574891 apresentou maiores valores para IMC ( $P = 0,0186$ ) e CC ( $P = 0,0395$ ), enquanto em ambos rs3125005 e rs3812604, os genótipos GG apresentaram valores de IMC aumentados ( $P < 0,0001$ ). Com relação às variáveis metabólicas, os genótipos rs3125005 diferiram nos níveis de colesterol LDL; com exceção do rs11574891, todos os SNPs variaram para os níveis de FPG e os genótipos rs2229971, rs3125005 e rs3812604 para Hb1Ac. Além disso, rs3125005 e rs3812604 apresentaram variação para hipertensão ( $P = 0,0168$ ) e PAS ( $P = 0,0307$ ), respectivamente.

Considerando que os genótipos diferiram em relação à ancestralidade e acima das variáveis clínicas, foi realizada uma regressão logística multinomial. Conforme mostrado na Tabela 2, após o ajuste para todas as variáveis de confusão no Modelo 2 (idade, gênero, ancestralidade, HDL, TG, hsCRP, Hb1Ac e hipertensão), o genótipo TT de rs9411207 permaneceu associado com sobrepeso / obesidade (OR

= 1,50, 95 % CI = 1,20-1,88;  $P = 0,0002$ ) (Tabela suplementar 5). Também incluímos o rs3124603 nos SNPs associados sugestivos, que têm uma significância aumentada no Modelo 2 e têm um LD moderado com rs9411207 (Figura 1). Neste último modelo, a inclusão da variável “fumo” não alterou a associação para rs9411207 (OR = 1,51, IC 95% = 1,20-1,89;  $P = 0,0003$ ) (Tabela Complementar 6).

Tabela 2. Associações de SNPs de *NOTCH1* com sobrepeso / obesidade sob o modelo aditivo ajustado para variáveis de confusão (Modelo 1 e 2)

SNP (consequência)	Genótipos	Peso normal N(%)	Sobrepeso/Obesidade N(%)	OR (95% IC) M1	P-valor M1	OR (95% IC) M2	P-valor M2
rs9411207 (intrônico)	CC	116(41.6%)	244(32.8%)	1.49 (1.21-1.85)	0.0002	1.50 (1.20-1.88)	0.0002
	CT	124(44.4%)	353(47.5%)				
	TT	39(14%)	146(19.7%)				
rs2229971 (sinônimo)	AA	127(45.5%)	266(35.8%)	1.46 (1.17-1.81)	0.0005	1.44 (1.15-1.81)	0.0013
	AG	114(40.9%)	347(46.8%)				
	GG	38(13.6%)	129(17.4%)				
rs11574891 (intrônico)	GG	137(48.9%)	304(40.9%)	1.43(1.15-1.77)	0.0012	1.41 (1.12-1.77)	0.0026
	GA	123(43.9%)	335(45.0%)				
	AA	20(7.1%)	105(14.1%)				
rs3125005 (intrônico)	AA	46(16.5%)	93(12.5%)	1.36 (1.10-1.67)	0.0038	1.35 (1.09-1.69)	0.0065
	AG	132(47.3%)	318(42.8%)				
	GG	101(36.2%)	332(44.7%)				
rs3812604 (intrônico)	AA	82(29.4%)	168(22.6%)	1.35 (1.10-1.65)	0.0041	1.38 (1.12-1.71)	0.0028
	GA	133(47.7%)	352(47.4%)				
	GG	64(22.9%)	222(29.9%)				
rs3124603 (intrônico)	TT	109(38.92%)	249(33.46%)	1.32 (1.07-1.63)	0.01	1.36 (1.09-1.69)	0.0068
	TC	122(43.57%)	346(46.50%)				
	CC	49(17.50%)	149(20.02%)				

IC: intervalo de confiança; OR: Odds Ratio. Modelo 1 (M1): Ajustado para idade, gênero e ancestralidade; Modelo 2 (M2): Ajustado para idade, sexo, ancestralidade, HDL, triglicérides, hsCRP e hemoglobina glicada.

## Estrutura LD e análise de haplótipos

Conforme demonstrado na figura 1, o rs9411207 mostrou LD alto com rs2229971 ( $D' = 0,93$  e  $r^2 = 0,79$ ) e rs11574891 ( $D' = 0,99$  e  $r^2 = 0,74$ ). Nós investigamos o efeito da associação combinada desses SNPs em uma análise de haplótipos. Considerando todos os haplótipos possíveis, sete haplótipos foram identificados (Tabela Suplementar 7). Destes, três tiveram uma frequência acima de 5% e o haplótipo GAT, envolvendo alelos de risco, foi mais frequente no sobrepeso / obesidade (32,30%) do que no peso normal (25,66%) (OR = 1,42; IC 95% = 1,14-1,78,  $P = 0,003$ ) (Tabela 3).

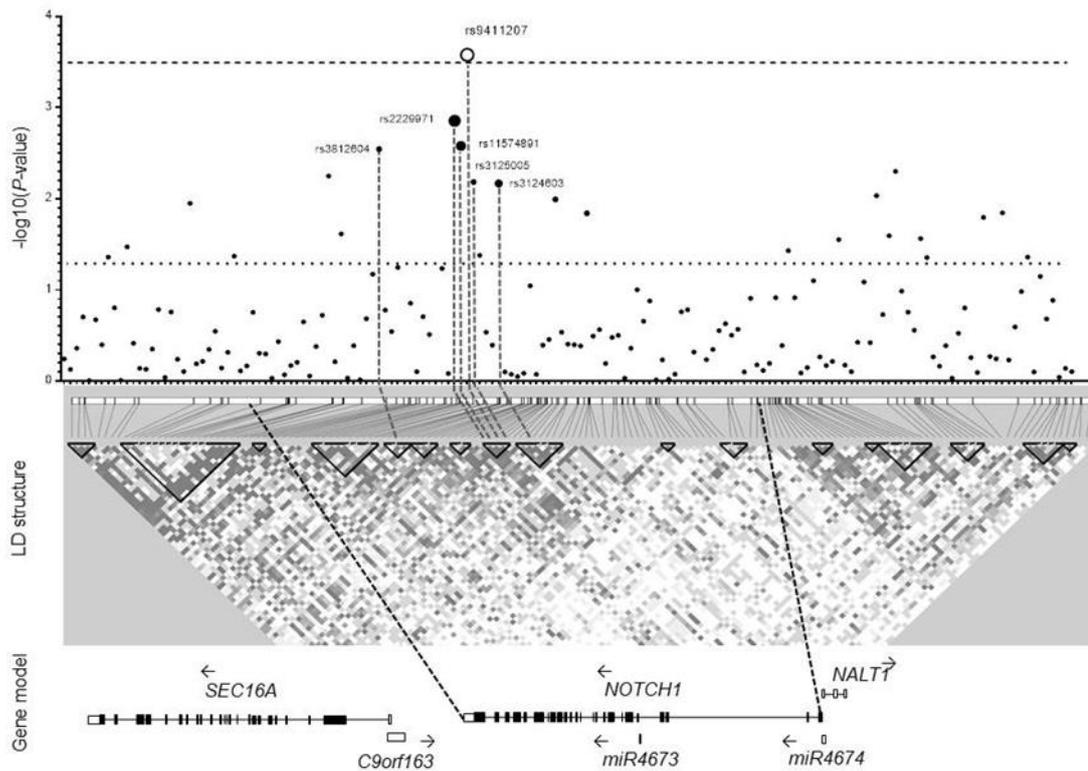


Figura 1. Gráfico de associação regional do gene NOTCH1 com sobrepeso / obesidade.  $-\log_{10}(P\text{-valor})$  é mostrado no painel superior, e o círculo branco representa o SNP rs9411207 associado e os círculos pretos os SNPs marginalmente associados. A dimensão dos círculos pretos é diretamente proporcional ao LD ( $r^2$ ) com rs9411207. A linha tracejada representa o  $P$ -valor da correção de Bonferroni e a linha pontilhada o valor  $P$  nominal. No meio, as linhas verticais tracejadas indicam a posição dos SNPs associados na estrutura LD. Os blocos de LD foram mostrados em triângulos pretos, representando LD alto. No painel inferior, mostramos a estrutura genômica. O mapa LD foi criado usando o software HaploView.

Tabela 3. Análise de haplótipo dos tag SNPs de NOTCH1, sob o modelo aditivo

no	rs2229971	rs11574891	rs9411207	Peso normal	Sobrepeso/Obesidade	Odds Ratio (95% IC)	P-valor
1	A	G	C	62.45%	54.97%	1	—
2	G	G	T	7.14%	6.79%	1.08(0.76-1.54)	0.80
3	G	A	T	25.66%	32.30%	1.42(1.14-1.78)	0.003

### Análise funcional *In silico*

A rVarBase previu que rs9411207, rs2229971, rs11574891, rs3125005, rs3812604 e rs3124603 estavam localizados em uma região que pode regular os elementos distais e ligados à proteína de RNA. Este banco de dados sugere que esses SNPs interagem com *NOTCH1*, *AGPAT2*, *C9orf163*, *NALT1* e os microRNAs miR4673 e miR4674, ambos originados da sequência do gene *NOTCH1*. Esses SNPs estão localizados na região interativa da cromatina com função de transcrição forte predominante em vários tipos de células, incluindo células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e núcleos adiposos (Tabela 4). O rs9411207 tem uma pontuação Regulome DB de 3a, e os SNPs rs11574891 e rs3125005 de 2b, prevendo seu papel como susceptível de afetar o nível de expressão do gene. Além disso, esta região é um sítio de ligação para RFX1, um regulador transcricional. O banco de dados HaploReg destacou ainda mais esses SNPs como marcadores de histonas no cérebro e tecidos musculares. Destes, apenas o SNP rs2229971 é susceptível de influenciar o aumento das marcadores de histonas em núcleos de gordura adiposa. Usando o portal GTEx, encontramos atividade eQTL significativa para o SNP rs3125005 relacionado a *CARD9* no tecido do pâncreas e *SEC16A* no estômago, para o SNP rs3812604 relacionado a *SDCCAG3* no tecido adiposo subcutâneo e para rs3124603 relacionado a *NALT1* no sangue total e outros tecidos.

Tabela 4. Análise funcional *In silico* dos tag SNPs de *NOTCH1*

SNP	Estado da cromatina	Genes de interação	Regulome Db	Marcadores de histona (enhancer)	Gtex (eQTL)
rs9411207	↑ (ADMSC; AN)	<i>NOTCH1</i> ; <i>AGPAT2</i> ; <i>C9orf163</i> ; <i>NALT1</i> ; <i>MIR4673</i> ; <i>MIR4674</i>	3a	CRB, MUS and 5 tecidos	—
rs2229971	Enhancer (AN) and ↑ (ADMSC)	<i>NOTCH1</i> ; <i>AGPAT2</i> ; <i>C9orf163</i> ; <i>NALT1</i> ; <i>MIR4673</i> ; <i>MIR4674</i>	4	AN, CRB, MUS and 8 tecidos	—
rs11574891	↑ (ADMSC; AN)	<i>NOTCH1</i> ; <i>AGPAT2</i> ; <i>C9orf163</i> ; <i>NALT1</i> ; <i>MIR4673</i> ; <i>MIR4674</i>	2b	CRB, MUS and 5 tecidos	—
rs3125005	↑ (ADMSC; AN)	<i>NOTCH1</i> ; <i>AGPAT2</i> ; <i>C9orf163</i> ; <i>NALT1</i> ; <i>MIR4673</i> ; <i>MIR4674</i>	2b	CRB, MUS and 5 tecidos	Pancreas, Estômago and WB
rs3812604	↑ (AN) and ↓ (ADMSC)	<i>C9orf163</i> ; <i>NOTCH1</i>	4	2 tecidos	Subcutâneo adiposo
rs3124603	↑ (AN) and ↓ (ADMSC)	<i>NOTCH1</i> ; <i>NALT1</i> ; <i>MIR4673</i> ; <i>MIR4674</i>	2b	CRB and 5 tecidos	WB and 3 tecidos

Os dados são derivados de rvarBase (<https://rv.psych.ac.cn>), RegulomeDB (<https://www.regulomedb.org>), HaploReg v4 (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) e portal Gtex (<https://www.gtexportal.org>). Abreviaturas: ADMSC, Cultura de células-tronco adiposas derivadas de células mesenquimais; AN, Núcleos Adiposos; CRB, Cérebro; MUS, músculo esquelético; WB, sangue total. ↑ significa transcrição forte e ↓ significa transcrição fraca.

## DISCUSSÃO

A via NOTCH conservada evolutiva emergiu como um regulador do metabolismo em estudos in vitro e em camundongos. (BARTOLOME et al., 2019; BI et al., 2014a; BOUCHER et al., 2020; LIU; LOGAN; NEWMAN, 2020) Com base nisso, avaliamos a associação genética de SNPs no gene *NOTCH1* e nas fronteiras com sobrepeso / obesidade em uma coorte de idosos brasileiros. Mostramos uma associação independente entre o rs9411207, localizado no íntron 13, e o risco de sobrepeso / obesidade conferido pelo genótipo TT. O rs9411207 está em LD com o SNP sinônimo rs2229971 e outros 4 SNPs intrônicos (rs11574891, rs3125005, rs3812604 e rs3124603) sugestivamente associados ao fenótipo. Além disso, o haplótipo GAT, dos SNPs rs2229971, rs11574891 e rs9411207, pode ser um fator de risco para sobrepeso / obesidade. Usando a análise funcional in silico, descobrimos que o rs2229971 estava localizado em uma região potenciadora, e todos os SNPs estavam localizados em uma região envolvida na regulação da transcrição de *NOTCH1* e outros genes.

SNPs intrônicos foram associados à obesidade, T2D e outros distúrbios metabólicos, por exemplo, variantes em *FTO* (FRAYLING et al., 2007) e *TCF7L2* (BRIDE et al., 2021; LOCKE et al., 2015; STRUAN F et al., 2006 ) O rs9411207 e os outros SNPs intrônicos estão em LD com o sinônimo rs2229971, que foi associado à válvula aórtica bicúspide (FOFFA et al., 2013) e câncer (JYK et al., 2018; LI et al., 2017), a análise funcional revelou que ambos os SNPs intrônicos e sinônimos podem afetar a expressão dos genes por diferentes mecanismos (COOPER, 2010; ROBERT; PELLETIER, 2018; SHAUL, 2017). De acordo com isso, as variantes intrônicas e sinônimas de *NOTCH1* foram associado à alta expressão de *NOTCH1* e seus genes alvos a jusante (CAO et al., 2014), bem como ao aumento do risco de defeitos de desenvolvimento (HELLE et al., 2019).

A estrutura do haplótipo forneceria informações cruciais para aumentar nossa compreensão sobre a interação entre as variações genéticas e os traços das doenças, bem como a região responsável por regular a expressão gênica. (NIANJUN; KUI; HONGYU, 2008) Porém, a possibilidade de LD com outras variantes reais funcionais ou não sinônimas associadas ao fenótipo não podem ser omitidas. É plausível que uma dessas variantes esteja em uma região regulatória e

que o alelo de risco aumente ou diminua a taxa de transcrição. (CHRISTINA; ALEJANDRA; LUIS, 2017)

Neste contexto, de acordo com a análise funcional in silico, o rs9411207 e outros SNPs podem interagir com a cromatina relacionada ao *NOTCH1* e outros genes. A rVarBase sugere que esta região interage com *AGPAT2*, que desencadeia a síntese de triglicerídeos dentro do adipócito (GARG, 2011) e regula a adipogênese (SUBAUSTE et al., 2012). Estudos em modelos in vitro e em camundongos mostraram que *AGPAT2* é essencial para o desenvolvimento pós-natal e manutenção de WAT e BAT, juntamente com a sinalização de insulina (CORTÉS et al., 2009; KELLY M et al., 2016; LILA et al., 2021). Além disso, as mutações de *AGPAT2* causam lipodistrofias humanas, que estão relacionadas com a síndrome metabólica, semelhante ao encontrado na obesidade (SUBAUSTE et al., 2012).

Além disso, os SNPs podem interagir com o gene *NALT1* de RNA não codificador longo e os microRNAs miR4673 e miR4674, todos envolvidos na expressão de *NOTCH1* por diferentes mecanismos. Embora a superexpressão de *NALT1* esteja associada à regulação positiva da via de sinalização de NOTCH1, (PIAO et al., 2019) o miR4673 e miR4674 podem estar envolvidos na inibição ou degradação de *NOTCH1* (SCOTT M, 2015). Além disso, o miR4673 está envolvido no reparo e inflamação do DNA da oxaguanina (HL et al., 2017) e o miR4674 na regulação da  $\gamma$ -sinucleína, um gene adipócito-neurônio com atividade aumentada na obesidade e controle do metabolismo lipídico corporal, (MILLERSHIP et al., 2013 ; PIETER J et al., 2008) e angiogênese (ICLI et al., 2020).

O rs11574891 e rs3125005 (pontuação 2b no Regulome DB) parecem estar em um sítio de ligação para RFX1, um fator de transcrição importante para adipogênese e implicado na síndrome de Alström, que é considerado um modelo humano para obesidade, T2D e outros distúrbios metabólicos (HEARN , 2019; PURVIS et al., 2010). Além disso, é importante observar que rs3125005, rs3812604 e rs3124603 estão na região eQTL. O genótipo GG para rs3125005 aumenta a expressão de *CARD9* no pâncreas e *SEC16A* no estômago, e o genótipo GG para rs3812604 aumenta o *SDCCAG3* no tecido adiposo subcutâneo. O *CARD9* desempenha um papel em várias doenças metabólicas, como obesidade, resistência à insulina e aterosclerose (TIAN et al., 2020). Junto com *SDCCAG3*, *CARD9*

também interage em uma rede conectando Diabetes tipo 1 e 2 (LIJUAN et al. ., 2020). O *SEC16A* é um efetor RAB10 necessário para o tráfego de GLUT4 estimulado por insulina em adipócitos (BRUNO et al., 2016). Os SNPs em *SEC16B*, um ortólogo *SEC16A*, estão consistentemente associados ao risco de obesidade, em diferentes populações (SAHIBDEEN et al., 2018).

O papel da via NOTCH na adipogênese não é totalmente compreendido. Há um crosstalk entre as vias de sinalização NOTCH1 e Wnt, que por sua vez regula negativamente a adipogênese (LIU; LOGAN; NEWMAN, 2020; SARAH E et al., 2000). Vários estudos afirmam ter papel positivo de *NOTCH1* para o processo de diferenciação de adipócitos (BA et al., 2012; GARCÉS et al., 1997; ROSS; RAO; KADESCH, 2004; URS et al., 2012), metabolismo energético e escurecimento dos adipócitos (BI et al., 2014a; GRIDLEY; KAJIMURA, 2014) ; PASUT et al., 2016; SHAN et al., 2017). A inibição ou deleção de *NOTCH1* reduz a massa WAT e aumenta a expressão de genes de assinatura BAT, promovendo a formação de adipócitos bege (WU et al., 2012). Além disso, aumenta o gasto de energia, melhora a sensibilidade à insulina e protege camundongos da obesidade induzida por uma dieta rica em gordura (BI et al., 2014b). Por outro lado, a ativação da sinalização NOTCH1 em adipócitos é suficiente para promover um fenótipo de clareamento no tecido adiposo perivascular (BOUCHER et al., 2020), com potencial contribuição para o risco cardiovascular.

Os pontos fortes do presente estudo incluem a análise de uma população multiétnica, o que aumenta o potencial de identificação de novos genes e variantes; e a mediana de idade de nossa população, que ultrapassa a idade de aparecimento de diabetes e obesidade, minimizando um viés típico na seleção do grupo controle (PAOLO et al., 2013). No entanto, nosso estudo tem potenciais limitações. (a) O tamanho da amostra pode enviesar os resultados. Como o SNP individual tem um pequeno impacto biológico, o tamanho da amostra pode ter sido insuficiente para uma análise estatística apropriada. (b) A classificação do IMC para a idade mediana de nossa coorte. Os idosos são particularmente suscetíveis à obesidade sarcopênica, que envolve a diminuição da massa muscular e óssea, enquanto o aumento da massa gorda. Assim, os valores de IMC aparentemente permanecem estáveis, sendo superestimados para os idosos com obesidade sarcopênica. (c)

Fatores ambientais. Embora a fumaça não tenha alterado nossos resultados, outros fatores importantes como atividade física e dieta não foram avaliados.

Apesar dessas limitações, nosso estudo fornece informações sobre achados experimentais anteriores sobre a sinalização NOTCH1 em adipócitos, adipogênese e metabolismo, melhorando a etiologia e patogênese do sobrepeso / obesidade humana. Portanto, pode ser usado para melhor caracterizar pessoas com peso excessivo em alto risco de desenvolvimento de doenças e direcionar biomarcadores causadores de doenças em estratégias personalizadas de prevenção e tratamento, fornecendo hipóteses para estudos futuros.

## **CONCLUSÃO**

Em resumo, nossos dados sugerem que o alelo T e o genótipo TT de rs9411207, bem como o haplótipo GAT no gene *NOTCH1* estão associados a um maior risco de sobrepeso / obesidade na população brasileira. As variantes de *NOTCH1* podem afetar a transcrição de genes relevantes para as vias adipogênicas e sustentam que é possível que a atividade anormal de NOTCH1 possa estar associada e / ou implicada no risco de sobrepeso / obesidade. Uma análise mais aprofundada será necessária para obter uma visão dos mecanismos subjacentes.

## **DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

As seguintes informações foram fornecidas com relação às aprovações éticas (ou seja, órgão de aprovação e quaisquer números de referência): O Estudo SABE foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (CAAE: 47683115.4.0000.5421, Revisão: 3.600 0,782). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## **DISPONIBILIDADE DE DADOS**

As seguintes informações foram fornecidas com relação à disponibilidade de dados: Dados brutos de nível individual não podem ser compartilhados publicamente devido às restrições do IRB. Os dados agregados estão disponíveis em <http://abraom.ib.usp.br/> e os dados genotípicos e fenotípicos em nível individual podem ser compartilhados mediante solicitação razoável e aprovação do contrato de colaboração em pesquisa. Para solicitar esses dados, entre em contato com o

administrador do banco de dados pelo e-mail abraom@ib.usp.br. Dados de sequenciamento: Os dados WGS estão disponíveis em Naslavsky et al (2020) (NASLAVSKY et al., 2020) arquivo suplementar no link: DOI 10.1101 / 2020.09.15.298026.

## **DIVULGAÇÃO**

O autor não relata conflitos de interesse neste trabalho.

## **FINANCIAMENTOS**

Este trabalho contou com o apoio do INCT / FAPESP via Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (2014 / 50931-3), FAPESP / CEPID (2013 / 08028-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento da Ciência e Tecnologia (CNPq-Casadinho-Procad / Edital 06, Ref. 552672 / 2011-4 / MCTI / MEC / CAPES); FAPES (0123/2016) e CAPES (19/2016) para bolsa de Estevão Carlos Silva Barcelos. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

## **CONTRIBUIÇÕES DE AUTORES**

Estevão Carlos Silva Barcelos: Conceptualização, Metodologia, Análise Formal, Investigação, Redação - Projecto Original. Michel Naslavsky: conceituação, metodologia, análise formal, validação, investigação, curadoria de dados, redação - revisão e edição, supervisão. Izadora Silveira Fernandes: Metodologia, Análise Formal, Redação - Minuta Original. Marília Scliar: Conceituação, Investigação, Redação - Revisão e Edição. Guilherme Lopes Yamamoto: Análise formal, Curadoria de dados, Redação - Revisão e Edição. Jaqueline Wang: Metodologia, Análise formal, Redação - Revisão e Edição. Lais Bride: Metodologia, Análise Formal, Redação - Minuta Original. Valdemir Pereira de Sousa: Redação - Minuta Original. Lucia HS Pimassoni: Metodologia, Análise formal, Redação - Revisão e Edição. Paolo Sportoletti: Redação - Revisão e Edição. Flavia de Paula: Redação - Revisão e Edição. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler: Redação - Revisão e Edição. Yeda Duarte: conceituação, curadoria de dados, redação - revisão e edição. Maria Rita Passos Bueno: Conceptualização, Redação - Revisão e Edição, Aquisição de financiamento. Mayana Zatz: Conceituação, Redação - Revisão e Edição, Aquisição de financiamento. Flávia Imbroisi Valle Errera: Conceituação, Metodologia, Análise

Formal, Investigação, Redação - Rascunho Original, Redação - Revisão e Edição, Supervisão.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a todos os voluntários e profissionais que participaram da pesquisa SABE.

## **REFERENCIAS**

ACIOLE, G. G.; BATISTA, L. H. Promoção da saúde e prevenção de incapacidades funcionais dos idosos na estratégia de saúde da família. *Saúde debate*, v. 37, n. 96, p. 10–19, 2013.

ANGELO, L. S.; KURZROCK, R. Turmeric and Green Tea: A Recipe for the Treatment of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 4, p. 1123–1125, 15 fev. 2009.

ARDLIE, K. G. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, v. 348, n. 6235, p. 648–660, 8 maio 2015.

ARRUGA, F.; VAISITTI, T.; DEAGLIO, S. The NOTCH pathway and its mutations in mature B cell malignancies *Frontiers in Oncology* *Frontiers Media S.A.*, , 26 nov. 2018. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 21 abr. 2021

BANDARANAYAKE, T.; SHAW, A. C. Host Resistance and Immune Aging. 2016.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.

BEARD, J. R. et al. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet (London, England)*, v. 387, n. 10033, p. 2145–2154, 21 maio 2016.

BERRY, L. W.; WESTLUND, B.; SCHEDL, T. Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development (Cambridge, England)*, v. 124, n. 4, p. 925–36, fev. 1997.

BI, P. et al. Notch signaling regulates adipose browning and energy metabolism. *Nature Medicine*, v. 20, n. 8, p. 911–918, 2014a.

- BI, P. et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nature Medicine* 2014 20:8, v. 20, n. 8, p. 911–918, 20 jul. 2014b.
- BOUCHER, J. M. et al. Pathological Conversion of Mouse Perivascular Adipose Tissue by Notch Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 40, p. 2227–2243, 2020.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 1 set. 2012.
- BRIDE, L. et al. TCF7L2 rs7903146 polymorphism association with diabetes and obesity in an elderly cohort from Brazil. *PeerJ*, v. 9, p. e11349, 5 maio 2021.
- BRUCE, B.; JOEL W, C.; JONATHAN L, T. Climate change, human health, and epidemiological transition. *Preventive medicine*, v. 70, p. 69–75, 1 jan. 2015.
- BULL, L. *Genetics, Mutations, and Polymorphisms*. 2013.
- C, A. et al. Caloric restriction in lean and obese strains of laboratory rat: effects on body composition, metabolism, growth and overall health. *Experimental physiology*, v. 100, n. 11, p. 1280–1297, 1 nov. 2015.
- CAO, Y.-W. et al. Notch1 single nucleotide polymorphism rs3124591 is associated with the risk of development of invasive ductal breast carcinoma in a Chinese population. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 7, n. 7, p. 4286–94, 2014.
- CAPACCIONE, K. M.; PINE, S. R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 7, p. 1420–1430, 1 jul. 2013.
- CARSTEN T, H.; FIORAN W, K. Adipose tissue browning in mice and humans. *The Journal of endocrinology*, v. 241, n. 3, p. R97–R109, 2019.
- CASTRO, M. C. et al. Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. *Nature Medicine*, jun. 2021.
- CORMIER-DAIRE, V. et al. Cryptic terminal deletion of chromosome 9q34: A novel cause of syndromic obesity in childhood? *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 4, p. 300–303, 2003.
- COYLE, P. K. Pharmacogenetic Biomarkers to Predict Treatment Response in Multiple Sclerosis: Current and Future Perspectives. *Multiple Sclerosis International*, v. 2017, p. 1–10, 2017.
- CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D. A. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annual Review of Medicine*, v. 56, n. 1, fev. 2005.

- DEREK M, H.; N, B. Contribution of adipose tissue to health span and longevity. *Interdisciplinary topics in gerontology*, v. 37, p. 1–19, 2010.
- DING, E. et al. Notch polymorphisms associated with sensitivity of noise induced hearing loss among Chinese textile factory workers. *BMC Medical Genetics* 2018 19:1, v. 19, n. 1, p. 1–9, 14 set. 2018a.
- DING, L. et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell*, v. 173, p. 305–320, 2018b.
- DUARTE, Y. A. DE O. et al. Fragilidade em idosos no município de São Paulo: prevalência e fatores associados. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology*, v. 21Suppl 02, n. Suppl 2, p. e180021, 2019.
- ELLEGREN, H.; GALTIER, N. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 2016 17:7, v. 17, n. 7, p. 422–433, 6 jun. 2016.
- FABBRI, G. et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 14, p. E2911–E2919, 4 abr. 2017.
- FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology* 2018 15:9, v. 15, n. 9, p. 505–522, 31 jul. 2018.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 216–229, abr. 2006.
- FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 908, p. 244–254, 2000.
- FRANCESCO, P. et al. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox biology*, v. 15, p. 170–181, 1 maio 2018.
- FRE, S. et al. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Experimental Cell Research*, v. 317, n. 19, p. 2740–2747, 15 nov. 2011.
- GABRIEL, S. B. et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 21 jun. 2002.
- GARG, V. et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, v. 437, n. 7056, p. 270–274, 17 set. 2005.

- GONÇALVES, M. V. et al. Chronic lymphocytic leukemia in Brazil: A retrospective analysis of 1903 cases. *American Journal of Hematology*, v. 92, n. 8, p. E171–E173, ago. 2017.
- GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, v. 23, n. 5, p. 644–645, 1 mar. 2007.
- GREENWALD, I.; KOVALL, R. Notch signaling: genetics and structure. *WormBook*, p. 1–28, 17 jan. 2013.
- GUO, L. et al. rVarBase: An updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D888–D893, 2016.
- H, Z.; R, P.; MH, G. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*, v. 4, n. 2, p. 171–178, mar. 2003.
- HALASCHEK-WIENER, J. et al. Genetic Variation in Healthy Oldest-Old. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6641, 14 ago. 2009.
- HALLEK, M. et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, v. 131, n. 25, p. 2745–2760, 21 jun. 2018.
- HARMAN, D. The aging process. *Basic life sciences*, v. 49, p. 1057–65, 1988.
- HAYNES, L. Aging of the Immune System: Research Challenges to Enhance the Health Span of Older Adults. *Frontiers in Aging*, v. 0, p. 2, 15 out. 2020.
- HÖFELMANN, D. A. et al. Chronic diseases and socioeconomic inequalities in quality of life among Brazilian adults: findings from a population-based study in Southern Brazil. *European Journal of Public Health*, v. 28, n. 4, p. 603–610, 1 ago. 2018.
- HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 15 maio 2013.
- HUNTER, D. J.; REDDY, K. S. Noncommunicable Diseases. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1109345>, v. 369, n. 14, p. 1336–1343, 2 out. 2013.
- IANNI, M. DI et al. A new genetic lesion in B-CLL: A NOTCH1 PEST domain mutation *British Journal of Haematology*, 2009.
- IBGE. IBGE | Projeção da população. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- ISMAIL, S.; ESSAWI, M. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, v. 1, n. 2, p. 57–63, jul. 2012.

- JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in Public Health*, v. 5, 11 dez. 2017.
- JEREMY D, W. Sarcopenia in older adults. *Current opinion in rheumatology*, v. 24, n. 6, p. 623–627, nov. 2012.
- KENNEDY, B. K. et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, v. 159, n. 4, p. 709–13, 6 nov. 2014.
- KIRSI A, V. The rediscovery of BAT in adult humans using imaging. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, v. 30, n. 4, p. 471–477, 1 ago. 2016.
- KOCAL, G. C.; BASKIN, Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. *Genetic Polymorphisms*, 6 set. 2017.
- KOCZIAN, F. et al. Targeting the endoplasmic reticulummitochondria interface sensitizes leukemia cells to cytostatics. *Haematologica*, v. 104, n. 3, p. 546–555, 28 fev. 2019.
- KRISS, C. L. et al. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, v. 120, n. 5, p. 1027–1038, 2 ago. 2012.
- KUMAR, V.; SHANBHAG, L. Curcumin in chronic lymphocytic leukemia- A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Shanbhag VKL*, 2017.
- KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* Taylor and Francis Ltd, , 2 set. 2019.
- KUROOKA, H.; KURODA, K.; HONJO, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse Notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 23, p. 5448–5455, 1 dez. 1998.
- LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 8, p. 794–798, 25 ago. 2016.
- LAURA M, P. et al. “Adipaging”: ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *The Journal of physiology*, v. 594, n. 12, p. 3187–3207, 15 jun. 2016.
- LI, L. J. et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on autophagy and apoptosis of human leukemia cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, n. 6, p. 7886–7892, 1 jun. 2018.

- LIU, J. et al. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 92, n. C, p. 367–409, 1 jan. 2010.
- LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015 518:7538, v. 518, n. 7538, p. 197–206, 11 fev. 2015.
- LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. *Cell*, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.
- MA, M. et al. Chronic non-communicable diseases and COVID-19: EPICOVID-19 Brazil results. *Revista de saude publica*, v. 55, p. 38, 2021.
- MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases Hindorff5,. *Nature*, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 2009.
- MARIE, N. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.
- MATUTES, E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, v. 8, n. 10, p. 1640–5, out. 1994.
- MCBRIDE, K. L. et al. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 18, p. 2886–2893, 15 set. 2008.
- MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Science Advances*, v. 5, n. 7, p. 9433–9464, 31 jul. 2019.
- MICHAEL B, S. et al. Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. *Physiology (Bethesda, Md.)*, v. 32, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2017.
- MOHR, O. L. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, v. 4, n. 3, p. 275–82, maio 1919.
- MOUSTAPHA, A. et al. Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. *Cell Death Discovery*, v. 1, n. 1, p. 15017, 26 dez. 2015.
- MULLEN, S. A. et al. A neurologist's guide to genome-wide association studies. *Neurology*, v. 72, n. 6, p. 558–565, 10 fev. 2009.

- NADEU, F. et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 127, n. 17, p. 2122–2130, 2016.
- NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation*, v. 38, n. 7, p. 751–763, jul. 2017.
- NASLAVSKY, M. S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil) *bioRxiv*, , 16 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.09.15.298026>>. Acesso em: 26 abr. 2021
- NG, A. P. P.; CHNG, W. J.; KHAN, M. Curcumin sensitizes acute promyelocytic leukemia cells to unfolded protein response-induced apoptosis by blocking the loss of misfolded N-CoR protein. *Molecular Cancer Research*, v. 9, n. 7, p. 878–888, jul. 2011.
- NICCOLI, T.; PARTRIDGE, L. Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology*, v. 22, n. 17, p. R741–R752, 11 set. 2012.
- NYAGA, D. M. et al. Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Genetic Variants Contribute to Overlapping Immune Regulatory Networks. *Frontiers in Genetics*, v. 0, p. 535, 21 nov. 2018.
- PAE, H. O. et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 353, n. 4, p. 1040–1045, 23 fev. 2007.
- PHAN, L. et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa)>.
- PUENTE, X. S. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, v. 475, n. 7354, p. 101–105, 5 jul. 2011.
- PUENTE, X. S. et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, v. 526, n. 7574, p. 519–524, 22 out. 2015.
- QUAN, X. et al. Single nucleotide polymorphism rs3124599 in Notch1 is associated with the risk of lung cancer in northeast Chinese non-smoking females. *Oncotarget*, v. 8, n. 19, p. 31180, 2017.
- RACHEL, N. Preventing and managing chronic diseases. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 364, 31 jan. 2019.

- RADHIKA, M. et al. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. *Aging cell*, v. 7, n. 3, p. 438–440, jun. 2008.
- RAI, K. R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American Journal of Hematology*, v. 91, n. 3, p. 330–340, 1 mar. 2016.
- REN, Y. et al. Curcumin relieves paraquat-induced lung injury through inhibiting the thioredoxin interacting protein/NLR pyrin domain containing 3-mediated inflammatory pathway. *Molecular medicine reports*, v. 20, n. 6, p. 5032–5040, 1 dez. 2019.
- REXFORD S, A. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature medicine*, v. 15, n. 9, p. 996–997, set. 2009.
- RIBEIRO, D. R. et al. PREVALÊNCIA DE DIABETES MELLITUS E HIPERTENSÃO EM IDOSOS. *Revista Artigos.Com*, v. 14, p. 2–7, 2020.
- RICHARD MATTHEW, D. et al. Prevalence and incidence of sarcopenia in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, v. 8, n. 2, p. 229–237, 1 abr. 2017.
- ROSATI, E. et al. Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood*, v. 116, n. 15, p. 2713–2723, 14 out. 2010.
- ROSATI, E. et al.  $\gamma$ -Secretase inhibitor I induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress increase and notch down-regulation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 000, 2012.
- ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in oncology*, v. 8, p. 229, 2018a.
- ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in oncology*, v. 8, p. 229, 2018b.
- ROSS, D. A.; RAO, P. K.; KADESCH, T. Dual Roles for the Notch Target Gene Hes-1 in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 8, p. 3505–3513, 15 abr. 2004.
- SANGMI, K. et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 18, n. 3, p. 816–820, mar. 2009.
- SCHAID, D. J. et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics*, v. 70, n. 2, p. 425–434, 1 fev. 2002.

- SCOTT, R. A. et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*, v. 66, n. 11, p. 2888–2902, nov. 2017.
- SHAH, P. A. et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2677, 2020.
- SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*, v. 97, p. 1235–1294, 2017.
- SIMÕES, C. C. S. Breve histórico do processo demográfico. Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI, 2016.
- SPORTOLETTI, P. et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *British Journal of Haematology* Br J Haematol, , nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813007/>>. Acesso em: 21 abr. 2021
- STEINE, I. M. et al. Implication of NOTCH1 gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims. *Translational Psychiatry*, v. 6, p. 1–9, 2016.
- TAM, V. et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, v. 20, n. 8, p. 467–484, 1 ago. 2019.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A haplotype map of the human genome. *Nature*, v. 437, n. 7063, p. 1299–1320, out. 2005.
- TING, L. et al. Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, v. 20, n. 6, p. 813–825, 2011.
- TIZHONG, S. et al. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *Journal of lipid research*, v. 54, n. 8, p. 2214–2224, ago. 2013.
- VASTRAD, B. et al. Bioinformatics Analysis of Key Genes and Pathways for Obesity Associated Type 2 Diabetes Mellitus as a Therapeutic Target. *bioRxiv*, p. 2020.12.25.424383, 27 dez. 2020.
- WALL, J. D.; PRITCHARD, J. K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, n. 8, p. 587–597, 1 ago. 2003.
- WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D877–D881, 2016.
- WHITEHEAD, A. et al. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. *Nature Communications* 2021 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–21, 26 mar. 2021.

- WHO. Obesity and overweight. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 29 jul. 2021.
- WHO. Noncommunicable diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- WILD, P. S. et al. Large-scale genome-wide analysis identifies genetic variants associated with cardiac structure and function. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 5, p. 1798–1812, 10 abr. 2017.
- WRIGHT, A. F. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. *Encyclopedia of Life Sciences*, 23 set. 2005.
- YAMAMOTO, S.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. Introduction to Notch Signaling. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). [s.l.: s.n.]. v. 1187p. 1–14.
- YANG, S.-M. et al. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? *Blood Reviews*, v. 29, n. 3, p. 205–213, 1 maio 2015.
- ZHANG, M. et al. Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? *Cancer Medicine*, v. 5, n. 8, p. 2048, 1 ago. 2016.
- ZOICO, E. et al. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Frontiers in Endocrinology*, v. 0, n. JUN, p. 368, 2019.
- ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nature protocols*, v. 2, n. 10, p. 2492, 2007.

## DADOS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Descrição dos tag SNPs de *NOTCH1* e bordas na coorte SABLE.

#	SNP	Posição (GRCh38)	Alelos	Gene : Consequência	HW P- valor	MAF
				<i>SEC16A</i>   <i>INPP5E</i> : UTR3		
1	rs1127152	136441147	A>G	upstream	0.80	0.41
2	rs7874956	136442361	T>G	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.74	0.46
3	rs4242709	136443070	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.88	0.11
4	rs3124996	136443286	T>C	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.92	0.30
5	rs190571105	136446329	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.68	0.02
6	rs45509099	136447803	T>C	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.45	0.02
7	rs35288226	136450914	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.10	0.24
8	rs45564338	136451470	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.36	0.01
9	rs45613441	136459985	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.88	0.08
10	rs57994353	136462535	T>C	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.28	0.27
11	rs140150555	136464204	C>T	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.40	0.03
12	rs142408856	136464447	C>T	<i>SEC16A</i> : sinônimo	1.00	0.03
13	rs12346977	136465376	G>A	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.10	0.04
14	rs116931252	136470267	G>C	<i>SEC16A</i> : intrônico	0.26	0.01
15	rs45459100	136474229	G>A	<i>SEC16A</i> : sinônimo	0.21	0.04
16	rs7022785	136474431	A>G	<i>SEC16A</i> : missense	0.66	0.04
17	rs148167113	136474614	G>A	<i>SEC16A</i> : missense	0.22	0.01
18	rs17567909	136474760	G>A	<i>SEC16A</i> : sinônimo	0.87	0.13
19	rs76562693	136475765	G>A	<i>SEC16A</i> : missense	1.00	0.04
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : intrônico		
20	rs112316758	136481340	G>A	upstream	0.87	0.02
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : intrônico		
21	rs190488261	136481385	G>A	upstream	1.00	0.04
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : intrônico		
22	rs7869821	136481430	G>A	upstream	0.09	0.14
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : intrônico		
23	rs76259794	136482953	C>A	upstream	0.28	0.23
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : intrônico		
24	rs7020201	136483046	C>G	UTR5	0.83	0.46
				<i>SEC16A</i>   C9orf163 : upstream		
25	rs1139057	136485868	C>T	UTR3	0.24	0.19
26	rs10870073	136489616	A>G	C9orf163 : None	0.32	0.19
27	rs57052773	136491249	T>C	C9orf163 : None	0.28	0.01
28	rs116846597	136492353	T>C	C9orf163 : None	0.89	0.02
29	rs7856092	136493166	A>G	C9orf163   <i>NOTCH1</i> : intergenic	0.88	0.20
30	rs9314867	136493394	C>T	C9orf163   <i>NOTCH1</i> : intergenic	0.32	0.49
31	rs75837171	136494184	C>G	<i>NOTCH1</i> : downstream	0.51	0.03
32	rs60543770	136494296	A>G	<i>NOTCH1</i> : downstream	0.25	0.04
33	rs6563	136494732	A>G	<i>NOTCH1</i> : UTR3	0.52	0.48
34	rs3124591	136495945	C>T	<i>NOTCH1</i> : UTR3	0.10	0.41
35	rs61751489	136496886	C>T	<i>NOTCH1</i> : missense	0.76	0.02
36	rs7852557	136498615	C>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.27	0.41
37	rs9632944	136498855	A>G	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.88	0.14
38	rs7029129	136499703	C>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.21	0.14
39	rs11574909	136500507	C>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.09	0.03
40	rs11574908	136500859	G>A	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.34	0.05
41	rs3124999	136501021	C>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.46	0.42
42	rs3124594	136501956	A>G	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.16	0.38
43	rs113377894	136502993	G>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.18	0.02
44	rs10125481	136504604	G>A	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.30	0.01
45	rs11574903	136504618	G>A	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.97	0.21
46	rs61751543	136506781	C>T	<i>NOTCH1</i> : missense	0.48	0.02

47	rs3124596	136507052	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.34	0.43
48	rs7870145	136507113	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.39	0.15
49	rs11574902	136507194	T>C	NOTCH1 : intrônico	0.72	0.12
50	rs112134816	136508206	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.79	0.02
51	rs3812604	136508507	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.30	0.48
52	rs11145765	136508828	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.72	0.11
53	rs11145766	136510443	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.75	0.14
54	rs3125001	136510809	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.74	0.46
55	rs117063264	136510898	G>A	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.03
56	rs3125002	136510909	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.15	0.38
57	rs139672274	136511558	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.41	0.01
58	rs3124600	136511882	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.17	0.41
59	rs72775784	136512044	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.27	0.07
60	rs180752476	136512844	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.89	0.02
61	rs3812608	136513000	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.05	0.42
62	rs114517771	136513299	T>C	NOTCH1 : intrônico	0.26	0.01
63	rs2229971	136513480	A>G	NOTCH1 : sinônimo	0.15	0.39
64	rs11574891	136514017	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.62	0.34
65	rs9411207	136514099	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.30	0.41
66	rs3125005	136514304	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.16	0.36
67	rs3812609	136514440	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.31	0.17
68	rs12001048	136515120	G>A	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.04
69	rs62579232	136515196	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.19	0.21
70	rs3124603	136515725	T>C	NOTCH1 : intrônico	0.06	0.42
71	rs3125006	136515972	A>G	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.13
72	rs4880099	136516137	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.23	0.40
73	rs11574887	136517167	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.79	0.05
74	rs11574886	136517212	C>A	NOTCH1 : intrônico	0.81	0.02
75	rs9411254	136517428	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.51	0.36
76	rs10870078	136519087	C>T	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   downstream	0.84	0.14
77	rs146264157	136519192	C>T	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   downstream	0.94	0.02
78	rs114239631	136520149	C>T	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   upstream	0.26	0.01
79	rs3125011	136520810	G>T	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   upstream	0.22	0.43
80	rs117803933	136520840	G>A	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   upstream	1.00	0.03
81	rs79769117	136520865	C>G	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   upstream	0.53	0.03
82	rs142663187	136521023	C>T	NOTCH1   MIR4673 : intrônico   upstream	0.34	0.03
83	rs61751557	136522881	G>A	NOTCH1 : sinônimo	0.22	0.01
84	rs4489420	136523808	A>G	NOTCH1 : sinônimo	0.05	0.43
85	rs138159889	136524699	G>A	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.03
86	rs77905917	136525068	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.38	0.01
87	rs115770975	136526019	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.22	0.01
88	rs7021932	136526138	T>C	NOTCH1 : intrônico	0.13	0.16
89	rs11574864	136526807	C>T	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.04
90	rs35608614	136527728	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.15	0.02
91	rs146815569	136527896	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.41	0.04
92	rs13285021	136529462	T>C	NOTCH1 : intrônico	0.13	0.19
93	rs113055984	136529830	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.92	0.04
94	rs9411257	136530146	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.43	0.36
95	rs117670131	136530409	G>C	NOTCH1 : intrônico	0.62	0.07
96	rs13290840	136531121	A>G	NOTCH1 : intrônico	0.11	0.42
97	rs73668319	136531163	G>A	NOTCH1 : intrônico	0.80	0.04
98	rs117705975	136531244	C>T	NOTCH1 : intrônico	1.00	0.03
99	rs79764723	136531624	C>T	NOTCH1 : intrônico	0.71	0.04

100	rs10870080	136534350	T>C	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.07	0.45
101	rs60544817	136534457	C>T	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.39	0.09
102	rs78664929	136534574	C>A	<i>NOTCH1</i> : intrônico	1.00	0.03
103	rs139376118	136535926	A>G	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.46	0.02
104	rs71508858	136535983	T>G	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.75	0.17
105	rs73567913	136537177	C>G	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.10	0.08
106	rs147485651	136542331	A>C	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.76	0.02
107	rs73668324	136542352	T>C	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.56	0.07
108	rs3013305	136542958	G>A	<i>NOTCH1</i> : intrônico	0.23	0.30
109	rs7028061	136545938	A>G	<i>NOTCH1</i>   <i>NALT1</i>   MIR4674 : UTR5   up   down	0.50	0.26
110	rs116201188	136546762	A>G	<i>NOTCH1</i>   <i>NALT1</i>   MIR4674 : up   up   up	0.24	0.05
111	rs2990583	136546871	T>C	<i>NOTCH1</i>   <i>NALT1</i>   MIR4674 : up   up   up	0.27	0.18
112	rs78875602	136547910	C>A	<i>NOTCH1</i>   <i>NALT1</i>   MIR4674 : up   none   up	0.36	0.05
113	rs3013308	136548550	G>A	<i>NALT1</i> : intrônico	0.50	0.06
114	rs3013309	136548801	A>G	<i>NALT1</i> : intrônico	0.18	0.36
115	rs11792084	136549235	G>T	<i>NALT1</i> : intrônico	0.24	0.49
116	rs710411	136549504	G>A	<i>NALT1</i> : intrônico	0.19	0.40
117	rs1058232	136549639	A>G	<i>NALT1</i> : none	0.12	0.27
118	rs10870081	136550111	C>T	<i>NALT1</i> : downstream	1.00	0.03
119	rs1110126	136550185	G>A	<i>NALT1</i> : downstream	1.00	0.09
120	rs9314868	136550475	G>A	<i>NALT1</i> : downstream	0.69	0.40
121	rs3013312	136551171	G>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.33	0.23
122	rs73567941	136551348	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.19	0.04
123	rs73567944	136551670	G>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	1.00	0.04
124	rs73567947	136551740	A>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.38	0.01
125	rs2990584	136552036	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.77	0.05
126	rs2095116	136552901	G>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.64	0.11
127	rs2990585	136553167	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.76	0.14
128	rs10870082	136554653	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	1.00	0.11
129	rs1571986	136555209	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.40	0.10
130	rs56235385	136556340	G>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.97	0.02
131	rs12685115	136556591	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.97	0.15
132	rs73668330	136556749	A>G	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.66	0.02
133	rs148021184	136558315	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.73	0.02
134	rs10781501	136559758	C>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.14	0.45
135	rs4242706	136560656	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.53	0.11
136	rs944754	136566988	C>G	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.62	0.11
137	rs59978396	136568313	G>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.41	0.01
138	rs59456072	136569438	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.60	0.02
139	rs7042742	136571182	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.80	0.04
140	rs56011832	136571327	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.64	0.18
141	rs6560637	136571625	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.46	0.24
142	rs117040488	136571922	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.08	0.02
143	rs145235137	136572593	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.36	0.01
144	rs10870085	136573733	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.68	0.27
145	rs78718864	136573924	C>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.94	0.05
146	rs117533136	136576144	T>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.12	0.03
147	rs181025844	136580052	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.24	0.01
148	rs11145785	136586938	C>A	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.36	0.03
149	rs944758	136589502	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.95	0.39
150	rs7021438	136590694	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.68	0.02
151	rs4880105	136591998	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.46	0.25
152	rs12682786	136592895	C>T	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.23	0.13
153	rs7030963	136593287	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.44	0.03
154	rs112785742	136593316	T>C	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	0.08	0.04
155	rs10116408	136594284	A>G	<i>NALT1</i>   LINC01451 : intergenic	1.00	0.04

156	rs10115243	136594440	C>T	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.52	0.32
157	rs7046856	136595539	A>G	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.66	0.06
158	rs914749	136596606	G>A	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.18	0.10
159	rs146811809	136596716	T>C	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.12	0.02
160	rs7848167	136598435	C>T	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.36	0.04
161	rs112417797	136598476	A>G	NALT1   LINC01451 : intergenic	0.24	0.01

Os dados de genes e consequências foram baseados no portal NCBI (dbSNP). O valor P de HW e o MAF dos tag SNPs de nossa coorte são mostrados nesta tabela.

Tabela suplementar 2. Valores de *P* para associações entre SNPs de *NOTCH1* e sobrepeso / obesidade em diferentes modelos genéticos, ajustados para variáveis de confundimento (Modelo 1)

SNP	codominante	dominante	recessivo	Super-dominante	log-aditivo
rs1127152	0.8673	0.6418	0.6929	0.8793	0.5938
rs7874956	0.8738	0.8524	0.6037	0.8016	0.6750
rs4242709	0.4475	0.2118	0.9637	0.2074	0.2503
rs3124996	0.3080	0.5463	0.1270	0.7465	0.2418
rs190571105	0.6498	0.9186	0.3533	0.9748	0.8212
rs45509099	0.3263	0.1647	0.4502	0.1976	0.1492
rs35288226	0.3611	0.7513	0.1553	0.6625	0.3999
rs45564338	0.0758	0.0254	0.4502	0.0325	0.0237
rs45613441	0.4227	0.2380	0.4315	0.3075	0.2039
rs57994353	0.7333	0.8316	0.5123	0.5636	0.9125
rs140150555	0.1886	0.0731	0.4893	0.0931	0.0678
rs142408856	0.4748	0.3845	0.4462	0.3374	0.4441
rs12346977	0.2124	0.9213	0.0804	0.7946	0.6741
rs116931252	0.6394	0.9351	0.3461	0.9311	0.8161
rs45459100	0.7131	0.5191	0.5189	0.6197	0.4571
rs7022785	0.2384	0.2621	0.1560	0.3665	0.1989
rs148167113	0.5570	0.6560	0.3739	0.5350	0.7915
rs17567909	0.1428	0.4555	0.0512	0.8901	0.2213
rs76562693	0.8221	0.9228	0.5327	0.9627	0.8847
rs112316758	0.6951	0.5723	0.4874	0.6222	0.5327
rs190488261	0.0438	0.0199	0.4718	0.0163	0.0265
rs7869821	0.9670	0.9603	0.7963	0.9585	0.8981
rs76259794	0.3880	0.9702	0.1864	0.5378	0.5843
rs7020201	0.7062	0.5969	0.4360	0.8783	0.4247
rs1139057	0.0847	0.9595	0.0327	0.3559	0.4889
rs10870073	0.6211	0.7455	0.3296	0.9219	0.5359
rs57052773	0.3169	0.6888	0.1305	0.9536	0.4875
rs116846597	0.1707	0.1528	0.1601	0.2164	0.1147
rs7856092	0.5897	0.3391	0.9071	0.3044	0.4401
rs9314867	0.1006	0.2644	0.1814	0.0327	0.9058
rs75837171	0.5031	0.2909	0.4863	0.3507	0.2570
rs60543770	0.9092	0.6661	0.9788	0.6635	0.6824
rs6563	0.7835	0.4955	0.7086	0.7593	0.5130
rs3124591	0.9291	0.7014	0.9057	0.7883	0.7468
rs61751489	0.4539	0.2644	0.4874	0.2956	0.2444
rs7852557	0.9016	0.9019	0.6500	0.8213	0.7432
rs9632944	0.8196	0.8206	0.6072	0.6845	0.9587
rs7029129	0.8108	0.5627	0.9036	0.5187	0.6464
rs11574909	0.2206	0.1511	0.2319	0.2175	0.1190
rs11574908	0.8750	0.6844	0.6951	0.7465	0.6430
rs3124999	0.6110	0.5028	0.3630	0.9628	0.3426
rs3124594	0.3051	0.2332	0.1878	0.8616	0.1279
rs113377894	0.0318	0.0102	0.3786	0.0144	0.0091
rs10125481	0.1447	0.3426	0.1501	0.1769	0.5767
rs11574903	0.1151	0.0406	0.3808	0.0844	0.0407
rs61751543	0.6637	0.9668	0.3739	0.8597	0.9307

rs3124596	0.5236	0.2554	0.7221	0.4303	0.3409
rs7870145	0.9607	0.7788	0.9226	0.7973	0.7790
rs11574902	0.3813	0.5406	0.1759	0.8251	0.3593
rs112134816	0.1602	0.0777	0.3288	0.1034	0.0659
rs3812604	0.0161	0.0263	0.0147	0.8424	0.0041
rs11145765	0.6654	0.4403	0.5349	0.5364	0.3883
rs11145766	0.4583	0.6717	0.2146	0.9727	0.4634
rs3125001	0.1509	0.1278	0.1046	0.9289	0.0530
rs117063264	0.3101	0.8439	0.1260	0.9696	0.6784
rs3125002	0.1851	0.0721	0.3488	0.3079	0.0828
rs139672274	0.2886	0.9127	0.1285	0.6686	0.8552
rs3124600	0.2595	0.1048	0.4373	0.3564	0.1299
rs72775784	0.4579	0.3463	0.3174	0.4763	0.2736
rs180752476	0.3098	0.8572	0.1260	0.9493	0.6854
rs3812608	0.0957	0.0529	0.1155	0.5755	0.0311
rs114517771	0.6207	0.8442	0.3288	0.9983	0.7170
rs2229971	0.0022	0.0009	0.0369	0.0822	0.0006
rs11574891	0.0030	0.0154	0.0024	0.6202	0.0013
rs9411207	0.0009	0.0012	0.0052	0.2920	0.0002
rs3125005	0.0138	0.0062	0.0635	0.1733	0.0039
rs3812609	0.1235	0.0529	0.8322	0.0408	0.0973
rs12001048	0.5203	0.5220	0.3152	0.5928	0.4641
rs62579232	0.1028	0.0851	0.5034	0.0348	0.2500
rs3124603	0.0362	0.0217	0.0671	0.4201	0.0101
rs3125006	0.8460	0.8721	0.6154	0.7464	0.9952
rs4880099	0.9126	0.6724	0.8398	0.7999	0.6913
rs11574887	0.3075	0.9111	0.1256	0.8933	0.7352
rs11574886	0.3628	0.9724	0.1577	0.8502	0.8072
rs9411254	0.1802	0.0648	0.4950	0.1794	0.0906
rs10870078	0.9998	0.9871	0.9873	0.9909	0.9849
rs146264157	0.1357	0.4476	0.0853	0.2989	0.6311
rs114239631	0.5636	0.3628	0.4879	0.4185	0.3305
rs3125011	0.0330	0.0370	0.0305	0.8470	0.0092
rs117803933	0.5335	0.3371	0.5150	0.3641	0.3173
rs79769117	0.6717	0.5515	0.5958	0.4684	0.6500
rs142663187	0.6671	0.5495	0.5958	0.4619	0.6538
rs61751557	0.5649	0.3790	0.4502	0.4517	0.3387
rs4489420	0.0335	0.0364	0.0322	0.8636	0.0092
rs138159889	0.6294	0.4953	0.5327	0.4610	0.5360
rs77905917	0.4485	0.2628	0.4502	0.3114	0.2368
rs115770975	0.5678	0.5428	0.3288	0.6782	0.4535
rs7021932	0.4280	0.2906	0.3052	0.4887	0.2155
rs11574864	0.4166	0.2883	0.4840	0.2592	0.3262
rs35608614	0.8124	0.9871	0.5280	0.8912	0.8778
rs146815569	0.8395	0.5955	0.7239	0.6440	0.5667
rs13285021	0.1462	0.1241	0.1058	0.3871	0.0635
rs113055984	0.0143	0.2323	0.0159	0.0946	0.4714
rs9411257	0.1864	0.3230	0.0753	0.7739	0.1052
rs117670131	0.8783	0.7072	0.7777	0.6651	0.7573
rs13290840	0.5231	0.2557	0.7523	0.3999	0.3436
rs73668319	0.5673	0.8809	0.3096	0.7303	0.9691
rs117705975	0.2639	0.8423	0.1140	0.6705	0.9830
rs79764723	0.8488	0.5709	0.8528	0.5902	0.5674
rs10870080	0.1986	0.0935	0.2574	0.5083	0.0774
rs60544817	0.6905	0.7486	0.3945	0.9387	0.6070
rs78664929	0.1599	0.5808	0.0588	0.7682	0.4280
rs139376118	0.3785	0.2897	0.4555	0.2378	0.3640
rs71508858	0.3826	0.2947	0.5476	0.1906	0.4722
rs73567913	0.5938	0.4902	0.3679	0.6672	0.3864
rs147485651	0.3003	0.4287	0.1501	0.5690	0.3284

rs73668324	0.6699	0.3796	0.7362	0.4175	0.3711
rs3013305	0.3932	0.1884	0.4568	0.3797	0.1777
rs7028061	0.5150	0.3312	0.7431	0.2499	0.5139
rs116201188	0.1860	0.1442	0.2120	0.2005	0.1126
rs2990583	0.9598	0.9160	0.7780	0.9908	0.8472
rs78875602	0.4217	0.7827	0.1904	0.9329	0.6546
rs3013308	0.9588	0.7847	0.9631	0.7740	0.8023
rs3013309	0.0775	0.8073	0.0267	0.2157	0.2048
rs11792084	0.3643	0.2356	0.7379	0.1824	0.5955
rs710411	0.1240	0.1067	0.0839	0.8002	0.0432
rs1058232	0.3287	0.2042	0.2525	0.5143	0.1397
rs10870081	0.6322	0.6404	0.3792	0.7103	0.5816
rs1110126	0.9458	0.8970	0.7842	0.8383	0.9563
rs9314868	0.1357	0.3135	0.0503	0.6331	0.0832
rs3013312	0.8316	0.6165	0.6341	0.7862	0.5527
rs73567941	0.9531	0.8077	0.8915	0.7773	0.8457
rs73567944	0.4270	0.4947	0.3207	0.3877	0.6198
rs73567947	0.1259	0.0456	0.5259	0.0534	0.0430
rs2990584	0.3494	0.3620	0.3183	0.2851	0.4559
rs2095116	0.3869	0.7607	0.2098	0.5043	0.9661
rs2990585	0.3283	0.5180	0.1500	0.8408	0.3232
rs10870082	0.1578	0.0712	0.3221	0.1195	0.0563
rs1571986	0.3789	0.2739	0.2783	0.4202	0.2040
rs56235385	0.0543	0.0174	0.5259	0.0201	0.0164
rs12685115	0.4107	0.1826	0.8060	0.2000	0.2075
rs73668330	0.1435	0.0544	0.5259	0.0626	0.0511
rs148021184	0.0250	0.0080	0.3461	0.0111	0.0071
rs10781501	0.1881	0.2798	0.0790	0.6619	0.0875
rs4242706	0.2865	0.1331	0.4110	0.1998	0.1144
rs944754	0.3314	0.2825	0.2169	0.4577	0.1966
rs59978396	0.1505	0.0567	0.5259	0.0663	0.0534
rs59456072	0.1926	0.0784	0.5259	0.0897	0.0734
rs7042742	0.4328	0.2406	0.5345	0.2580	0.2280
rs56011832	0.2970	0.4229	0.2984	0.1979	0.7603
rs6560637	0.3127	0.1809	0.7898	0.1274	0.3336
rs117040488	0.9272	0.9185	0.6974	0.9952	0.8494
rs145235137	0.3048	0.4154	0.1501	0.5866	0.3043
rs10870085	0.2810	0.1198	0.4198	0.2516	0.1175
rs78718864	0.5318	0.7535	0.2692	0.8501	0.6682
rs117533136	0.4592	0.9927	0.2191	0.8192	0.8473
rs181025844	0.0054	0.0027	0.5082	0.0016	0.0062
rs11145785	0.9021	0.7143	0.7546	0.7673	0.6779
rs944758	0.5676	0.9580	0.3068	0.4948	0.5718
rs7021438	0.1084	0.0388	0.5259	0.0448	0.0365
rs4880105	0.7564	0.4642	0.9481	0.4730	0.5324
rs12682786	0.5080	0.3465	0.3680	0.5098	0.2735
rs7030963	0.2354	0.2593	0.3083	0.1697	0.3850
rs112785742	0.0655	0.0509	0.4331	0.0246	0.1161
rs10116408	0.6476	0.4611	0.5345	0.4895	0.4383
rs10115243	0.2387	0.1321	0.2409	0.4094	0.0908
rs7046856	0.3108	0.2570	0.2577	0.3116	0.2191
rs914749	0.3326	0.1430	0.5920	0.1871	0.1402
rs146811809	0.7349	0.6928	0.5277	0.6398	0.7516
rs7848167	0.3887	0.7701	0.1699	0.9535	0.6197
rs112417797	0.8200	0.8589	0.5331	0.9297	0.7979

---

Tabela suplementar 3. Comparações de frequências SNP do projeto ALFA e coorte SABE

SNP	Alelos	Projeto		P-valor	Peso normal	P-valor	Sobrepeso/ Obesidade	P-valor
		ALFA	Coorte SABE					
rs9411207	C	0.65	0.59	—	0.64	—	0.57	—
	T	0.35	0.41	0.38	0.36	0.88	0.43	0.22
rs2229971	A	0.66	0.61	—	0.66	—	0.59	—
	G	0.34	0.39	0.46	0.34	1.00	0.41	0.58
rs11574891	G	0.66	0.65	—	0.71	—	0.63	—
	A	0.34	0.35	0.88	0.29	0.45	0.37	0.96
rs3125005	A	0.45	0.36	—	0.40	—	0.34	—
	G	0.55	0.64	0.19	0.60	0.47	0.66	0.29
rs3812604	A	0.56	0.48	—	0.53	—	0.46	—
	G	0.44	0.52	0.26	0.47	0.73	0.54	0.18

Tabela suplementar 4. Diferenças em variáveis de coorte de acordo com tag SNPs do gene *NOTCH1*

Variáveis	rs9411207			P-valor
	CC	CT	TT	
N (%)	361(35.25%)	478(46.67%)	185(18.06%)	
Mulheres/Homens	234/126	298/179	125/60	0.44
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.02(16.19-47.05)	27.54(15.13-53.61)	27.93(19.12-47.33)	0.07
CC (cm)	94(62-129)	95(64-142)	95(65-140)	0.47
<i>Freq ancestralidade</i>				
Européia	77.35%	73.44%	60.8%	<0.001
Africana	16.09%	17.74%	21.81%	0.13
Asiática	0.04%	1.87%	10.59%	<0.001
Nativo americana	6.54%	6.89%	6.79%	0.37
Hipertensão (%)	233(22.75%)	336(32.81%)	133(12.98%)	0.11
PAS (mmHg)	136(89-236)	140(88-250)	137(89-242)	0.08
PAD (mmHg)	78(50-125)	80(49-117)	80(54-123)	0.31
HDL (mg/dl)	48(20-107)	48(23-106)	49(19-133)	0.33
LDL (mg/dl)	128(41-235)	121(54-299)	127(28-261)	0.03
CT (mg/dl)	205(89-317)	200(110-388)	210(86-344)	0.11
TG (mg/dl)	114(25-505)	119(38-1283)	113(38-389)	0.73
T2D (%)	81(7.91%)	125(12.20%)	53(5.17%)	0.24
FPG (mg/dl)	87(41-331)	89.5(20-437)	90(37-290)	0.01
Hb1Ac (%)	5.8(4.8-13.4)	5.8(4.9-13.7)	5.9(4.9-13.6)	0.09
hsCRP (mg/L)	2.07(0.14-80.5)	2.49(0.14-68.3)	2.31(0.14-141)	0.50

Variáveis	rs2229971			P-value
	AA	AG	GG	
N (%)	394(38.47%)	462(45.11%)	167(16.30%)	
Mulheres/Homens	256/137	287/174	113/54	0.41
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.02(16.19-51.02)	27.55(15.13-53.61)	28.10(19.12-45.24)	0.06

CC (cm)	94(62-129)	95(64-142)	96(65-140)	0.28
<i>Freq ancestralidade</i>				
Européia	79.32%	71.8%	58.4%	<0.0001
Africana	14.48%	18.76%	23.65%	0.00
Asiática	0.04%	2.15%	11.15%	0.05
Nativo americana	6.15%	7.24%	6.80%	0.00
Hipertensão (%)	254(24.80%)	327(31.93%)	120(11.71%)	0.08
PAS (mmHg)	136(89-236)	140(88-250)	139(96-242)	0.09
PAD (mmHg)	78(50-125)	80(49-117)	80.5(54-123)	0.18
HDL (mg/dl)	48(20-106)	48(19-107)	50(22-133)	0.41
LDL (mg/dl)	128(41-235)	122(28-299)	127(58-261)	0.36
CT (mg/dl)	204(89-317)	200.5(86-388)	209(117-344)	0.47
TG (mg/dl)	114(25-505)	117.5(38-1283)	115(38-389)	0.89
T2D (%)	89(8.69%)	121(11.81%)	49(4.78%)	0.20
FPG (mg/dl)	87(41-331)	89.5(20-437)	93(37-290)	0.00
Hb1Ac (%)	5.8(4.8-13.4)	5.8(4.9-13.7)	5.9(4.9-13.6)	0.01
hsCRP (mg/L)	2.06(0.14-50.6)	2.49(0.14-80.5)	2.28(0.14-141)	0.25

	rs11574891			P-value
	GG	GA	AA	
N (%)	441(43.06%)	458(44.72%)	125(12.2%)	
Mulheres/Homens	285/155	286/171	86/39	0.42
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.16(16.19-47.05)	27.52(15.13-53.61)	28.48(21.03-47.3)	0.02
CC (cm)	94(62-140)	94(64-142)	97(73-138)	0.04
<i>Freq ancestralidade</i>				
Européia	70.5%	73.66%	71.93%	0.40
Africana	21.27%	18.0%	16.83%	0.04
Asiática	0.78%	1.52%	4.70%	0.00
Nativo americana	7.47%	6.74%	6.55%	0.16
Hipertensão (%)	290(28.32%)	319(31.15%)	93(9.08%)	0.14
PAS (mmHg)	136(89-250)	139(88-231)	138(89-242)	0.13
PAD (mmHg)	78(50-125)	80(49-123)	80(54-123)	0.25
HDL (mg/dl)	88(41-361)	88(20-437)	90(56-290)	0.09
LDL (mg/dl)	48(20-107)	49(23-124)	46(19-133)	0.76
CT (mg/dl)	127(41-235)	122(54-299)	129(28-261)	0.23
TG (mg/dl)	204(89-317)	202(110-388)	208(86-344)	0.44
T2D (%)	112(10.93%)	114(14.06%)	33(3.22%)	0.92
FPG (mg/dl)	113(25-1283)	117(38-1185)	117(42-389)	0.72
Hb1Ac (%)	2.26(0.14-80.5)	2.4(0.14-141)	2.43(0.16-21.4)	0.65
hsCRP (mg/L)	5.8(4.8-13.4)	5.8(4.9-13.7)	5.8(4.9-13.6)	0.69

rs3125005

	AA	GA	GG	P-value
<i>N</i> (%)	140(13.6%)	451(44.0%)	433(42.3%)	
Mulheres/Homens	92/47	283/167	282/151	0.69
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	27.86(15.68-47.33)	27.43(15.13-53.61)	26.8(17.78-42.26)	<0.0001
CC (cm)	96(64-140)	93(64-142)	94(62-123)	0.06
<i>Freq ancestralidade</i>				
Européia	79.74%	76.33%	66.23%	<0.0001
Africana	12.77%	15.49%	22.06%	0.13
Asiática	0.05%	1.77%	4.78%	0.13
Nativo americana	7.47%	6.37%	6.91%	0.25
Hipertensão (%)	87(8.49%)	298(29.10%)	317(30.95%)	0.02
PAS (mmHg)	133.5(95-221)	138(88-236)	139(89-250)	0.05
PAD (mmHg)	77(50-108)	79(49-125)	80(51-123)	0.05
HDL (mg/dl)	47(20-106)	49(23-107)	47(19-133)	0.47
LDL (mg/dl)	132(41-235)	123(45-299)	125(28-261)	0.05
CT (mg/dl)	209(89-313)	202(101-388)	204(86-344)	0.22
TG (mg/dl)	116(25-505)	117.5(30-1283)	114(38-528)	0.78
T2D (%)	35(3.41%)	104(10.15%)	120(11.71%)	0.26
FPG (mg/dl)	84(41-331)	88(40-361)	89(20-437)	0.01
Hb1Ac (%)	5.7(4.8-13.4)	5.8(4.8-13.0)	5.8(4.8-13.7)	0.05
hsCRP (mg/L)	1.81(0.14-41)	2.41(0.14-80.5)	2.45(0.14-141)	0.07

	rs3812604			P-value
	AA	GA	GG	
<i>N</i> (%)	251(24.51%)	487(47.55%)	286(27.92%)	
Mulheres/Homens	152/98	314/172	191/95	0.35
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	26.94(15.44-51.02)	27.57(15.13-53.61)	27.60(16.19-45.24)	<0.0001
CC (cm)	94(62-129)	94(64-142)	95(65-140)	0.71
<i>Freq ancestralidade</i>				
Européia	63.01%	74.13%	80.29%	<0.0001
Africana	12.98%	16.79%	24.08%	0.01
Asiática	0.02%	2.25%	6.18%	0.01
Nativo americana	6.68%	6.82%	6.69%	0.49
Hipertensão (%)	160 (15.62%)	333 (32.51%)	209 (20.41%)	0.07
PAS (mmHg)	136(95-231)	137(89-242)	141(88-250)	0.03
PAD (mmHg)	78(50-112)	79(49-125)	81(51-123)	0.11
HDL (mg/dl)	47 (20-106)	48 (23-106)	49 (19-133)	0.09
LDL (mg/dl)	129 (41-299)	123 (45-261)	125 (28-238)	0.12
CT (mg/dl)	205 (89-388)	201 (101-344)	205 (86-340)	0.54
TG (mg/dl)	122(25-505)	116.5(30-1283)	111.5(38-421)	0.43
T2D (%)	53 (5.17%)	123 (12.01%)	83 (8.10%)	0.10
FPG (mg/dl)	96.12 (41-361)	88 (20-437)	91 (23-315)	0.01

Hb1Ac (%)	5.7(4.8-13.4)	5.8(4.8-13.7)	5.8(4.8-12.4)	0.02
hsCRP (mg/L)	2.1(0.14-80.5)	2.28(0.14-68.3)	2.45(0.14-141)	0.42

Os resultados são apresentados como medianas e valores extremos (mínimo e máximo). Os valores de *P* indicam diferenças entre os genótipos de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. Os valores em negrito denotam significância estatística no nível *P* <0,05.

Tabela suplementar 5. Valores de *P* para associações entre SNPs de *NOTCH1* e sobrepeso / obesidade sob diferentes modelos genéticos, ajustados para variáveis de confusão (Modelo 2)

SNP	codominante	dominante	recessivo	Super-dominante	log-aditivo
rs1127152	0.8473	0.6602	0.6228	0.9561	0.5702
rs7874956	0.8991	0.9220	0.6474	0.7768	0.7441
rs4242709	0.6167	0.3634	0.8682	0.3277	0.4361
rs3124996	0.4034	0.3318	0.2352	0.8123	0.1984
rs190571105	0.9045	0.9543	0.6611	0.9251	0.9835
rs45509099	0.4082	0.2417	0.4026	0.2979	0.2129
rs35288226	0.5494	0.6208	0.2787	0.9303	0.3986
rs45564338	0.1264	0.0481	0.4026	0.0642	0.0438
rs45613441	0.3573	0.1794	0.4546	0.2319	0.1568
rs57994353	0.9194	0.8537	0.7713	0.7276	0.9821
rs140150555	0.1043	0.0356	0.4708	0.0470	0.0337
rs142408856	0.4989	0.3437	0.5384	0.3117	0.3860
rs12346977	0.3242	0.9251	0.1353	0.8457	0.7239
rs116931252	0.6068	0.8671	0.3176	0.9830	0.7402
rs45459100	0.5917	0.5534	0.3424	0.7129	0.4446
rs7022785	0.2381	0.2107	0.1896	0.2910	0.1643
rs148167113	0.6202	0.7825	0.3829	0.6555	0.9141
rs17567909	0.0717	0.4274	0.0227	0.9316	0.1743
rs76562693	0.6369	0.5310	0.5089	0.4907	0.5782
rs112316758	0.9191	0.7982	0.7370	0.8137	0.7843
rs190488261	0.0227	0.0085	0.5517	0.0071	0.0112
rs7869821	0.8784	0.7169	0.6563	0.8436	0.6472
rs76259794	0.5289	0.9216	0.2716	0.6535	0.6092
rs7020201	0.7508	0.5201	0.5589	0.9150	0.4492
rs1139057	0.1108	0.6861	0.0363	0.6536	0.2837
rs10870073	0.8494	0.8512	0.5682	0.9533	0.7184
rs57052773	0.1786	0.7624	0.0638	0.8901	0.4832
rs116846597	0.0905	0.0571	0.1791	0.0857	0.0428
rs7856092	0.9280	0.7215	0.9583	0.6991	0.7751
rs9314867	0.0601	0.0952	0.3040	0.0191	0.6812
rs75837171	0.3999	0.1840	0.6010	0.2147	0.1758
rs60543770	0.7901	0.5137	0.7217	0.5612	0.4943
rs6563	0.7907	0.5200	0.6588	0.8263	0.5040
rs3124591	0.8987	0.8720	0.7206	0.6704	0.9289
rs61751489	0.6500	0.3770	0.7370	0.3872	0.3698
rs7852557	0.9723	0.8141	0.9583	0.8521	0.8505
rs9632944	0.8370	0.6017	0.8792	0.5570	0.6750
rs7029129	0.8633	0.5898	0.9273	0.6019	0.6214
rs11574909	0.2892	0.3043	0.1730	0.4529	0.2242
rs11574908	0.8288	0.9808	0.5454	0.9041	0.8772
rs3124999	0.6906	0.5836	0.4213	0.9311	0.4179
rs3124594	0.4132	0.3095	0.2529	0.8975	0.1899
rs113377894	0.0211	0.0062	0.4177	0.0085	0.0056
rs10125481	0.1123	0.3474	0.1160	0.1645	0.6124
rs11574903	0.0742	0.0253	0.3107	0.0629	0.0243
rs61751543	0.6747	0.9732	0.3829	0.8664	0.9250

rs3124596	0.6921	0.4083	0.6247	0.6957	0.4106
rs7870145	0.8132	0.8990	0.5559	0.7596	0.9663
rs11574902	0.2411	0.3512	0.1149	0.6210	0.2067
rs112134816	0.1577	0.0814	0.2875	0.1129	0.0671
rs3812604	0.0116	0.0152	0.0155	0.9987	0.0028
rs11145765	0.3192	0.2327	0.2506	0.3625	0.1667
rs11145766	0.2898	0.4779	0.1271	0.8019	0.2867
rs3125001	0.1482	0.1685	0.0807	0.8940	0.0565
rs117063264	0.9537	NA	NA	NA	NA
rs3125002	0.2683	0.1071	0.4885	0.3096	0.1399
rs139672274	0.3589	0.9973	0.1613	0.7596	0.7892
rs3124600	0.3296	0.1366	0.5979	0.3289	0.1966
rs72775784	0.4305	0.4154	0.2439	0.5973	0.3084
rs180752476	0.9520	NA	NA	NA	NA
rs3812608	0.1646	0.0965	0.1542	0.6847	0.0580
rs114517771	0.5544	0.9940	0.2875	0.8203	0.8277
rs2229971	0.0055	0.0025	0.0446	0.1288	0.0014
rs11574891	0.0058	0.0263	0.0038	0.6997	0.0026
rs9411207	0.0012	0.0024	0.0036	0.4390	0.0003
rs3125005	0.0228	0.0104	0.0788	0.2116	0.0066
rs3812609	0.0890	0.0286	0.7912	0.0318	0.0418
rs12001048	0.3997	0.3361	0.2953	0.3956	0.2919
rs62579232	0.2171	0.1803	0.5195	0.0869	0.4029
rs3124603	0.0256	0.0176	0.0477	0.4339	0.0068
rs3125006	0.8074	0.6803	0.6921	0.5830	0.7960
rs4880099	0.9463	0.7609	0.9806	0.7574	0.8459
rs11574887	0.2787	0.9025	0.1198	0.6941	0.8931
rs11574886	0.5713	0.9388	0.2912	0.9353	0.8239
rs9411254	0.1680	0.0590	0.5278	0.1553	0.0899
rs10870078	0.9722	0.8783	0.8318	0.9293	0.8438
rs146264157	0.1432	0.2719	0.1457	0.1772	0.4030
rs114239631	0.6107	0.3692	0.5940	0.4045	0.3489
rs3125011	0.0333	0.0573	0.0211	0.9170	0.0101
rs117803933	0.4589	0.3240	0.3927	0.3690	0.2915
rs79769117	0.5039	0.4493	0.3280	0.5254	0.3924
rs142663187	0.5107	0.4596	0.3280	0.5410	0.3994
rs61751557	0.6030	0.4744	0.4026	0.5799	0.4117
rs4489420	0.0491	0.0563	0.0378	0.9712	0.0144
rs138159889	0.4218	0.2822	0.5089	0.2533	0.3211
rs77905917	0.4767	0.3111	0.4026	0.3795	0.2731
rs115770975	0.5676	0.7896	0.2875	0.9810	0.6419
rs7021932	0.5038	0.4675	0.2799	0.7331	0.3328
rs11574864	0.3989	0.2756	0.4772	0.2457	0.3150
rs35608614	0.7770	0.9631	0.4923	0.8508	0.9311
rs146815569	0.7380	0.4420	0.7867	0.4705	0.4361
rs13285021	0.1901	0.1944	0.1091	0.5215	0.0998
rs113055984	0.1170	0.1496	0.1963	0.1021	0.2201
rs9411257	0.1554	0.4774	0.0540	0.5036	0.1324
rs117670131	0.2754	0.8039	0.1213	0.6434	0.9716
rs13290840	0.5693	0.3515	0.8630	0.3092	0.5856
rs73668319	0.5190	0.7961	0.2907	0.6408	0.9564
rs117705975	0.4861	0.9679	0.2320	0.8968	0.8414
rs79764723	0.3924	0.1734	0.7023	0.1916	0.1735
rs10870080	0.2460	0.0942	0.6473	0.2349	0.1646
rs60544817	0.6031	0.6199	0.3340	0.8258	0.4801
rs78664929	0.9123	NA	NA	NA	NA
rs139376118	0.1930	0.3871	0.1629	0.2433	0.5826
rs71508858	0.3961	0.2888	0.5744	0.1953	0.4496
rs73567913	0.5275	0.3444	0.4024	0.4800	0.2805
rs147485651	0.2216	0.3272	0.1160	0.4670	0.2349

rs73668324	0.5730	0.2924	0.8924	0.2997	0.3144
rs3013305	0.4262	0.1953	0.8229	0.2422	0.2706
rs7028061	0.3313	0.4204	0.3288	0.1898	0.7949
rs116201188	0.2420	0.1437	0.3389	0.1782	0.1235
rs2990583	0.8722	0.6102	0.9877	0.6085	0.6650
rs78875602	0.4269	0.9097	0.1925	0.9293	0.7651
rs3013308	0.8932	0.6353	0.9052	0.6477	0.6374
rs3013309	0.0363	0.6769	0.0108	0.2052	0.1219
rs11792084	0.3004	0.1527	0.9272	0.1827	0.4073
rs710411	0.1093	0.0951	0.0761	0.7888	0.0371
rs1058232	0.2896	0.1929	0.2107	0.5349	0.1216
rs10870081	0.9113	0.8326	0.6995	0.8502	0.8164
rs1110126	0.9330	0.7264	0.8432	0.7601	0.7113
rs9314868	0.1201	0.3270	0.0425	0.5731	0.0792
rs3013312	0.8167	0.6234	0.5948	0.8162	0.5432
rs73567941	0.7303	0.5723	0.6786	0.4899	0.6766
rs73567944	0.2729	0.4587	0.1920	0.3339	0.6086
rs73567947	0.0887	0.0289	0.6281	0.0319	0.0281
rs2990584	0.3721	0.5405	0.2401	0.4271	0.6695
rs2095116	0.1228	0.4295	0.0950	0.1905	0.7890
rs2990585	0.1681	0.7079	0.0590	0.8073	0.3759
rs10870082	0.1918	0.1184	0.2268	0.2150	0.0818
rs1571986	0.3100	0.5952	0.1284	0.9349	0.3788
rs56235385	0.0333	0.0095	0.6281	0.0105	0.0092
rs12685115	0.2497	0.1187	0.8333	0.0958	0.1863
rs73668330	0.0810	0.0263	0.6281	0.0288	0.0254
rs148021184	0.0183	0.0058	0.3176	0.0084	0.0050
rs10781501	0.2466	0.2453	0.1263	0.8627	0.1032
rs4242706	0.3506	0.2414	0.2698	0.3961	0.1755
rs944754	0.2847	0.4420	0.1277	0.7352	0.2759
rs59978396	0.0866	0.0281	0.6281	0.0310	0.0273
rs59456072	0.1295	0.0458	0.6281	0.0499	0.0442
rs7042742	0.7412	0.5641	0.5808	0.5901	0.5424
rs56011832	0.5135	0.4587	0.5339	0.2964	0.6884
rs6560637	0.4923	0.2780	0.9048	0.2355	0.4102
rs117040488	0.6126	0.8973	0.3570	0.7140	0.9286
rs145235137	0.2602	0.4335	0.1160	0.6438	0.2992
rs10870085	0.3507	0.1549	0.4848	0.2855	0.1577
rs78718864	0.4996	0.6344	0.2622	0.7318	0.5533
rs117533136	0.6262	0.9028	0.3333	0.9868	0.8033
rs181025844	0.0225	0.0092	0.6121	0.0068	0.0160
rs11145785	0.7036	0.6363	0.4570	0.7625	0.5388
rs944758	0.7914	0.7577	0.4980	0.8519	0.5704
rs7021438	0.0490	0.0147	0.6281	0.0161	0.0143
rs4880105	0.6257	0.4240	0.7707	0.3362	0.5871
rs12682786	0.4575	0.3436	0.2994	0.5444	0.2538
rs7030963	0.0997	0.0630	0.4937	0.0409	0.1038
rs112785742	0.0321	0.0173	0.6338	0.0091	0.0437
rs10116408	0.8441	0.8240	0.5808	0.8560	0.7945
rs10115243	0.1822	0.0721	0.3605	0.2057	0.0710
rs7046856	0.3286	0.2386	0.3072	0.2825	0.2083
rs914749	0.3160	0.1370	0.5413	0.1892	0.1301
rs146811809	0.9208	0.8887	0.7107	0.8672	0.9110
rs7848167	0.3519	0.9089	0.1500	0.8808	0.7249
rs112417797	0.8080	0.8530	0.5179	0.9300	0.7873

Tabela suplementar 6. Valores de *P* para associações entre SNPs de *NOTCH1* e sobrepeso / obesidade sob diferentes modelos genéticos, ajustados para variáveis de confundimento (Modelo 2 + fumo)

SNP	codominante	dominante	recessivo	Super-dominante	log-aditivo
rs1127152	0.8753	0.6537	0.7015	0.8852	0.6058
rs7874956	0.8385	0.9712	0.5682	0.6676	0.7257
rs4242709	0.7721	0.4970	0.9362	0.4723	0.5532
rs3124996	0.4865	0.4084	0.2798	0.8757	0.2587
rs190571105	0.9264	0.9853	0.6979	0.9618	0.9915
rs45509099	0.4064	0.2222	0.4611	0.2633	0.2016
rs35288226	0.4686	0.5363	0.2276	0.9765	0.3203
rs45564338	0.1605	0.0624	0.4611	0.0780	0.0578
rs45613441	0.3575	0.1764	0.4690	0.2264	0.1556
rs57994353	0.8743	0.9810	0.6170	0.8044	0.8189
rs140150555	0.1539	0.0572	0.4765	0.0744	0.0531
rs142408856	0.3551	0.2183	0.5315	0.1931	0.2550
rs12346977	0.3449	0.9643	0.1477	0.8197	0.7692
rs116931252	0.5148	0.8748	0.2504	0.9303	0.7121
rs45459100	0.7722	0.9666	0.4790	0.8877	0.8389
rs7022785	0.3659	0.3393	0.2433	0.4292	0.2799
rs148167113	0.5739	0.7177	0.3663	0.5834	0.8619
rs17567909	0.0887	0.3896	0.0300	0.8555	0.1646
rs76562693	0.4703	0.5256	0.3290	0.4487	0.6154
rs112316758	0.9373	0.7844	0.8063	0.7929	0.7769
rs190488261	0.0355	0.0135	0.5665	0.0116	0.0172
rs7869821	0.9846	0.9689	0.8605	0.9756	0.9269
rs76259794	0.4604	0.8307	0.2175	0.6942	0.5116
rs7020201	0.7726	0.5769	0.5440	0.9945	0.4743
rs1139057	0.1365	0.7053	0.0465	0.6591	0.3086
rs10870073	0.7651	0.7900	0.4659	0.9627	0.6293
rs57052773	0.1197	0.8894	0.0415	0.7268	0.5475
rs116846597	0.0898	0.0460	0.2403	0.0651	0.0369
rs7856092	0.9686	0.8124	0.8847	0.8548	0.8005
rs9314867	0.0280	0.0945	0.1589	0.0076	0.8532
rs75837171	0.4095	0.1888	0.6226	0.2170	0.1815
rs60543770	0.9651	0.8123	0.8631	0.8412	0.7961
rs6563	0.8940	0.6826	0.7164	0.9438	0.6363
rs3124591	0.9376	0.7766	0.9060	0.7227	0.8994
rs61751489	0.6872	0.4005	0.8063	0.4063	0.3963
rs7852557	0.9504	0.9157	0.8042	0.7739	0.9520
rs9632944	0.8029	0.5637	0.8631	0.5144	0.6451
rs7029129	0.8456	0.5665	0.9401	0.5735	0.6042
rs11574909	0.3285	0.2979	0.2182	0.4191	0.2310
rs11574908	0.6976	0.9769	0.4121	0.8040	0.8661
rs3124999	0.7632	0.6489	0.4887	0.9303	0.4925
rs3124594	0.4766	0.5138	0.2363	0.8055	0.2786
rs113377894	0.0134	0.0036	0.4933	0.0046	0.0034
rs10125481	0.0870	0.3228	0.0944	0.1455	0.5896
rs11574903	0.0848	0.0323	0.2579	0.0867	0.0268
rs61751543	0.6198	0.8167	0.3663	0.7022	0.9342
rs3124596	0.8651	0.6725	0.6506	0.9659	0.5926
rs7870145	0.8939	0.9648	0.6523	0.8549	0.9343
rs11574902	0.2853	0.3756	0.1393	0.6399	0.2310
rs112134816	0.1916	0.0924	0.3618	0.1186	0.0802
rs3812604	0.0232	0.0423	0.0165	0.7398	0.0063
rs11145765	0.3671	0.2398	0.3102	0.3558	0.1823
rs11145766	0.3066	0.3871	0.1522	0.6681	0.2365
rs3125001	0.1873	0.1653	0.1173	0.9793	0.0701
rs117063264	0.7168	NA	NA	NA	NA
rs3125002	0.4579	0.2304	0.4716	0.5465	0.2265

rs139672274	0.3627	0.8994	0.1730	0.6704	0.8836
rs3124600	0.5215	0.2688	0.5354	0.5813	0.2772
rs72775784	0.4971	0.5053	0.2718	0.6924	0.3862
rs180752476	0.6948	NA	NA	NA	NA
rs3812608	0.1574	0.1148	0.1165	0.8305	0.0547
rs114517771	0.6521	0.9802	0.3618	0.8739	0.8498
rs2229971	0.0063	0.0029	0.0459	0.1369	0.0016
rs11574891	0.0069	0.0474	0.0032	0.9059	0.0044
rs9411207	0.0013	0.0033	0.0029	0.5207	0.0003
rs3125005	0.0277	0.0147	0.0686	0.2746	0.0077
rs3812609	0.1653	0.0587	0.7966	0.0651	0.0781
rs12001048	0.4361	0.3467	0.3324	0.4009	0.3064
rs62579232	0.2814	0.2259	0.5489	0.1195	0.4542
rs3124603	0.0367	0.0197	0.0801	0.3561	0.0105
rs3125006	0.8516	0.7853	0.6762	0.6789	0.8993
rs4880099	0.8499	0.5949	0.9858	0.6028	0.7247
rs11574887	0.1652	0.8784	0.0665	0.6061	0.8515
rs11574886	0.6055	0.9613	0.3186	0.9205	0.8524
rs9411254	0.1572	0.0544	0.5695	0.1341	0.0906
rs10870078	0.9578	0.9468	0.7933	0.8779	0.9883
rs146264157	0.1599	0.3087	0.1471	0.2041	0.4499
rs114239631	0.7430	0.5019	0.6521	0.5342	0.4808
rs3125011	0.0370	0.0544	0.0255	0.9858	0.0110
rs117803933	0.4112	0.3154	0.3281	0.3726	0.2749
rs79769117	0.5100	0.7095	0.2545	0.8327	0.6059
rs142663187	0.5150	0.7420	0.2545	0.8742	0.6304
rs61751557	0.6198	0.4424	0.4611	0.5223	0.3961
rs4489420	0.0668	0.0580	0.0590	0.8566	0.0200
rs138159889	0.3592	0.3518	0.3290	0.2895	0.4316
rs77905917	0.4727	0.2803	0.4611	0.3302	0.2536
rs115770975	0.6514	0.7336	0.3618	0.8781	0.6252
rs7021932	0.5046	0.4355	0.2934	0.6853	0.3144
rs11574864	0.3059	0.1951	0.4749	0.1708	0.2293
rs35608614	0.7257	0.8435	0.4667	0.7337	0.9536
rs146815569	0.7059	0.4694	0.5868	0.5384	0.4272
rs13285021	0.2152	0.1475	0.1727	0.3634	0.0909
rs113055984	0.1480	0.2806	0.1396	0.1924	0.3988
rs9411257	0.1651	0.3386	0.0632	0.7056	0.1007
rs117670131	0.1301	0.5623	0.0655	0.3815	0.7797
rs13290840	0.6892	0.4169	0.9948	0.4368	0.5817
rs73668319	0.6326	0.9486	0.3522	0.8078	0.9158
rs117705975	0.3620	0.8912	0.1544	0.9367	0.7354
rs79764723	0.3380	0.1408	0.7680	0.1507	0.1482
rs10870080	0.2799	0.1128	0.5094	0.3428	0.1497
rs60544817	0.6416	0.7220	0.3514	0.9354	0.5669
rs78664929	0.9104	NA	NA	NA	NA
rs139376118	0.2896	0.4947	0.2087	0.3404	0.6864
rs71508858	0.4306	0.2827	0.6631	0.2059	0.4219
rs73567913	0.5357	0.3086	0.4802	0.4130	0.2687
rs147485651	0.1989	0.3568	0.0944	0.5176	0.2488
rs73668324	0.4766	0.2250	0.8866	0.2308	0.2482
rs3013305	0.4538	0.2088	0.6890	0.3045	0.2502
rs7028061	0.3811	0.4388	0.3740	0.2153	0.7899
rs116201188	0.2330	0.1229	0.3995	0.1470	0.1089
rs2990583	0.7074	0.4361	0.8937	0.4067	0.5370
rs78875602	0.4216	0.9618	0.1908	0.8736	0.8104
rs3013308	0.9521	0.7601	0.8985	0.7772	0.7541
rs3013309	0.0535	0.6171	0.0161	0.2707	0.1231
rs11792084	0.2805	0.1645	0.7851	0.1455	0.4862
rs710411	0.1089	0.1255	0.0598	0.9578	0.0408

rs1058232	0.3296	0.2589	0.2003	0.6706	0.1541
rs10870081	0.8097	0.5616	0.7505	0.5718	0.5532
rs1110126	0.9275	0.7859	0.7430	0.8496	0.7417
rs9314868	0.0881	0.2830	0.0302	0.5593	0.0582
rs3013312	0.8011	0.6174	0.5691	0.8258	0.5288
rs73567941	0.7932	0.6323	0.7154	0.5566	0.7253
rs73567944	0.2245	0.3876	0.1758	0.2725	0.5313
rs73567947	0.0741	0.0237	0.5922	0.0268	0.0229
rs2990584	0.3382	0.5180	0.2200	0.4028	0.6507
rs2095116	0.1777	0.5235	0.1188	0.2572	0.8811
rs2990585	0.1415	0.5873	0.0487	0.9037	0.2841
rs10870082	0.1377	0.0712	0.2403	0.1362	0.0505
rs1571986	0.3424	0.4747	0.1579	0.7655	0.3084
rs56235385	0.0160	0.0042	0.5922	0.0048	0.0041
rs12685115	0.2035	0.1105	0.6888	0.0766	0.1968
rs73668330	0.0602	0.0189	0.5922	0.0211	0.0181
rs148021184	0.0255	0.0092	0.2504	0.0147	0.0076
rs10781501	0.2431	0.1964	0.1454	0.9921	0.0951
rs4242706	0.2662	0.1634	0.2506	0.2911	0.1170
rs944754	0.2905	0.3441	0.1506	0.5896	0.2186
rs59978396	0.0594	0.0184	0.5922	0.0207	0.0177
rs59456072	0.0639	0.0202	0.5922	0.0226	0.0194
rs7042742	0.7663	0.6516	0.5458	0.6853	0.6226
rs56011832	0.6314	0.4937	0.6636	0.3662	0.6754
rs6560637	0.5923	0.3239	0.9522	0.3207	0.4163
rs117040488	0.6277	0.8576	0.3818	0.6805	0.9708
rs145235137	0.2264	0.4510	0.0944	0.6833	0.3005
rs10870085	0.3392	0.1810	0.3166	0.4169	0.1415
rs78718864	0.4082	0.5911	0.2006	0.7124	0.4936
rs117533136	0.5569	0.9681	0.2878	0.8327	0.9036
rs181025844	0.0454	0.0168	0.6976	0.0141	0.0241
rs11145785	0.6091	0.7717	0.3272	0.9452	0.6229
rs944758	0.6416	0.8953	0.4038	0.4642	0.7342
rs7021438	0.0772	0.0252	0.5922	0.0280	0.0242
rs4880105	0.8169	0.5250	0.8637	0.5687	0.5584
rs12682786	0.4063	0.3840	0.2248	0.6425	0.2598
rs7030963	0.1435	0.1087	0.4312	0.0691	0.1757
rs112785742	0.0590	0.0397	0.5188	0.0197	0.0943
rs10116408	0.8320	0.9206	0.5458	0.9603	0.8829
rs10115243	0.2901	0.1554	0.2876	0.4220	0.1157
rs7046856	0.4365	0.3619	0.3213	0.4179	0.3203
rs914749	0.4287	0.1952	0.6925	0.2353	0.2002
rs146811809	0.8405	0.7167	0.6654	0.6877	0.7494
rs7848167	0.3009	0.9916	0.1274	0.7632	0.7978
rs112417797	0.8612	0.9848	0.5863	0.9554	0.9288

---

Tabela suplementar 7. Frequências de haplótipos derivadas do haplótipo rs2229971\_rs11574891\_rs9411207

no	rs2229971	rs11574891	rs9411207	Todos os indivíduos	Peso normal	Sobrepeso/Obesidade
1	A	A	T	4.03%	3.44%	4.25%
2	A	G	C	57.02%	62.45%	54.97%
3	A	G	T	0%	0%	0%
4	G	A	C	0.05%	0%	0.07%
5	G	A	T	30.49%	25.67%	32.30%
6	G	G	C	1.52%	1.29%	1.61%
7	G	G	T	6.88%	7.14%	6.79%

## 5.2 ARTIGO PARA SUBMISSÃO: Resposta integrada ao estresse em Leucemia Linfocítica Crônica

Artigo referente ao estudo de células de LLC com mutação no gene *NOTCH1* e sua resposta ao fármaco curcumina. O referido artigo deverá ser submetido em revista de grande impacto tendo o estudante de doutorado Estevão Carlos Silva Barcelos como primeiro autor. Segue a partir da próxima página o artigo na íntegra.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

**RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA**

**VITÓRIA**  
**2021**

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS

RESPOSTA INTEGRADA AO ESTRESSE EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA

Artigo adicionado à tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paolo Sportoletti

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA

2021

## Resposta integrada ao estresse em Leucemia Linfocítica Crônica

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS<sup>1,2</sup> et al.

Autor correspondente: PAOLO SPORTOLETTI<sup>2</sup>

Email: paolo.sportoletti@unipg.it

<sup>1</sup> Programa de pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Hematologia - Centro di Ricerca Emato-Oncologica (CREO), Departamento de Medicina e Cirurgia, Universidade de Perugia, Perugia, Italia.

### RESUMO

**Introdução:** A ativação constitutiva da sinalização de NOTCH1 está associada ao pior prognóstico na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), e mutações recorrentes de *NOTCH1* são responsáveis pela estabilização do estado de sinalização.

**Objetivo:** Investigamos o efeito anti-LLC da curcumina e sua capacidade de interferir na resposta integrada ao estresse e na via de sinalização NOTCH1 em células primárias com mutação no gene *NOTCH1* e no modelo murino de LLC E $\mu$ -TCL1.

**Métodos:** Foram analisados dados de expressão gênica de células com mutação em *NOTCH1* em confronto com dados de células Wild-Type. Células primárias de LLC foram coletadas e cultivadas com curcumina para posterior análise com Western blotting e PCR em tempo real. Além disso, utilizamos o modelo murino de LLC E $\mu$ -TCL1 no tratamento com a curcumina.

**Resultados:** A análise *in silico* da expressão gênica das células de LLC com mutação de *NOTCH1* mostraram um aumento na expressão de genes envolvidos no estresse de Retículo Endoplasmático (RE) e resposta do estresse integrado (ISR). Após a exposição *in vitro* à curcumina, um composto natural que tem como alvo o estresse do ER, encontramos um ISR aumentado em células primárias com *NOTCH1* mutado em comparação com células WT. Essa resposta foi precedida por uma liberação precoce de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma das células de LLC mutadas em *NOTCH1*, que pode desencadear e manter o estresse do RE. Além disso, a curcumina causou níveis mais elevados de apoptose em células de LLC portadoras da mutação de *NOTCH1*, independentemente da carga alélica, quando comparada

com células WT. A sinalização de NOTCH1 parece ser modulada após a exposição à curcumina. Em particular, as células de LLC mutadas em *NOTCH1* mostraram redução na porção ativa de NOTCH1 (ICN1) e nas proteínas da família BCL2 anti-apoptóticas (BCL2 e MCL1), e a combinação de curcumina com o venetoclax anti-BCL2, parece ter um efeito sinérgico em células de LLC. Finalmente, a administração *in vivo* de curcumina no modelo E $\mu$ -TCL1 reduziu significativamente a porcentagem de células leucêmicas CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> infiltrantes no fígado e na medula óssea, com inibição concomitante da sinalização de NOTCH1 em células leucêmicas na medula óssea.

**Conclusão e perspectivas:** Nossos resultados sugerem que a ativação de ISR induzida por estresse de RE e a inibição da sinalização de NOTCH1 convergem para a amplificação da morte de células de LLC e fornecem uma chave direcionável para o gerenciamento de LLC.

**Palavras-chave:** Mutação de *NOTCH1*; resposta integrada ao estresse; resposta de proteína não dobrada; estresse de retículo endoplasmático; curcumina, LLC

## **INTRODUÇÃO**

A sinalização de NOTCH1 desregulada está implicada na resistência a apoptose e na sobrevivência de células de leucemia linfocítica crônica (LLC) (ROSATI et al., 2018b). O acúmulo do domínio intracelular de NOTCH1 (ICN1) e a subsequente estabilização da via de sinalização são frequentemente observados em células de LLC que abrigam mutações de *NOTCH1*. Como a lesão genética mais comum na LLC (aproximadamente 13-15% dos pacientes, no momento do diagnóstico (PUENTE et al., 2015; VAVROVA et al., 2017), a mutação de *NOTCH1* é associada prognóstico desfavorável, refratariedade ao tratamento e maior risco de transformação em síndrome de Richter (ARRUGA et al., 2014; PUENTE et al., 2011; SPOROLETTI et al., 2010). Assim, a compreensão dos mecanismos e vias associadas à ativação constitutiva da sinalização de NOTCH1 pode fornecer o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica potencial de grande interesse no manejo da LLC.

Dada a alta taxa de proliferação e subsequente aumento da demanda por síntese de proteínas, o direcionamento ao retículo endoplasmático (RE) oferece uma nova

abordagem terapêutica no tratamento da leucemia. Sob condições de estresse do Retículo Endoplasmático (RE), o acúmulo de proteínas não dobradas ou dobradas incorretamente no RE resulta na ativação da Resposta de Proteína Não Dobrada (UPR), seguida pela dissociação da proteína chaperona regulada por glicose 78 (HSPA5 / GRP78, também conhecida como BiP) e subsequentemente ativação de três sensores ativadores de UPR: cinase ER semelhante a PKR (PERK), fator de transcrição 6 ativado (ATF6) e endonuclease 1 $\alpha$  regulada por inositol (IRE $\alpha$ ). Assim, o estresse do RE e outros estímulos de estresse ativam a Resposta Integrada ao Estresse (ISR) para restaurar a homeostase celular, o que leva a indução de genes selecionados, como o fator de transcrição ATF4 e a inibição global da tradução de proteínas. No entanto, sob estresse severo e prolongado, esse programa homeostático pode conduzir a sinalização em direção à morte celular, por meio de interações com a proteína homóloga C / EBP pró-apoptótica (CHOP). UPR e ISR também são acompanhados por interrupção da homeostase do Ca<sup>2+</sup> intracelular e regulação negativa das proteínas da família Bcl-2 anti-apoptóticas (Marciniak et al, 2004), conferindo uma maior sensibilidade à apoptose induzida por estresse no RE.

Nossos estudos anteriores mostraram que as células de LLC exibem uma via apoptótica desencadeada por estresse do RE funcional que pode ser ainda mais potenciada por indutores de estresse do RE e uma UPR protetora contribuindo para a sobrevivência anômala das células de LLC, sugerindo que a via de estresse do RE / UPR pode ser um alvo em CLL (Rosati 2010 Blood). Também demonstramos que o inibidor de  $\gamma$ -secretase I (GSI), usado para inibir a sinalização de NOTCH, induz nas células de LLC um forte efeito apoptótico mediado por uma via dependente do estresse do RE e inibição da ativação de NOTCH1 / 2, mesmo se a interação entre NOTCH e a via de estresse do RE / UPR não foram exploradas (Rosati 2013).

Com base em todas as observações acima, formulamos a hipótese de que a indução de resposta do estresse integrado e consequente inibição de NOTCH1 podem representar uma estratégia para controlar as células de LLC. Em outro contexto que não LLC, a curcumina exibiu atividade como indutor de estresse de RE e inibidor de NOTCH1. Assim, investigamos os efeitos da curcumina no contexto da LLC com desregulação na via de sinalização de NOTCH1.

## MÉTODOS

### Fonte de dados, pré-processamento e análise diferencial

Os dados de expressão gênica foram obtidos do banco de dados público do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia GEO (Barrett, T. et al., 2013) com o número de acesso GSE131114, GSE75122 e GSE92626. Neste estudo, selecionamos 52 amostras; incluindo 21 amostras de LLC com mutação de *NOTCH1* e 31 amostras de *NOTCH1* WT. Para manter a consistência ao longo do estudo, foram excluídas séries de amostras para ICN1 negativo ou mutações em outros genes. Dados de microarray normalizados foram transformados em log<sub>2</sub> e fragmentos normalizados por quilobase de modelo de exon por milhão de leituras mapeadas (FPKM) contendo valores de dados de RNA-Seq foram transformados seguindo Mooney et al. (2013). Os dados RNA-Seq transformados foram combinados com conjuntos de dados de microarray com ID Entrez exclusivo. A função Combat do pacote SVA R (LEEK; JOHNSON, 2012) foi usada para ajustar os efeitos de lote conhecidos de conjuntos de dados combinados de diferentes GSEs. A análise do Rank Product foi usada para calcular os valores do Rank Product (RP) que foram baseados na fold change (FC) do rank usando o pacote RankProd R (Hong, 2006). A taxa de descoberta falsa (FDR) usando o método Benjamini-Hochberg (BH) foi controlada em 0,01, abaixo da qual todos os genes foram extraídos representando listas de genes DE para cada comparação de dados de microarray e RNA-Seq. Como o produto de classificação é um método baseado em classificação e os valores de FC eram heterogêneos, um valor de FC maior do que 1 foi identificado como genes DE regulados positivamente e menos de 1 identificado como genes DE regulados negativamente. O teste de correlação de pares de logFC dos genes DE para as duas comparações dentro e entre as duas tecnologias foi realizado usando o teste de correlação de “Spearman” na base R.

### Ontologia genética (GO) e análise de enriquecimento de vias

Para realizar a análise funcional da lista de genes resultante com o Gene Ontology (GO), as anotações foram realizadas usando o pacote clusterProfiler do Bioconductor em R (Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q. -Y., 2012). O

enriquecimento funcional foi realizado para cada comparação contra as três categorias GO (BP, CC e MF). Genoma de anotação ampla, com base no mapeamento usando Entrez Gene Identifiers (“org.Hs.eg.db”), o método do valor p ajustado foi Benjamini e Hochberg (BH), e os pontos de corte para os valores p e q foram definidos como 0,05 . Os termos GO redundantes foram eliminados usando a função “simplificar” do pacote clusterProfiler. O último pacote também foi usado para visualizar algumas categorias e genes GO usando um gráfico de mapa de calor (heatmap) e uma rede circular (cnetplot). O enriquecimento da via da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) também foi realizado.

### **Análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA)**

A análise de enriquecimento do conjunto de genes (GSEA) foi realizada usando o método pré-classificado na implementação GSEA Java. A lista de genes, organizada por escores z em ordem decrescente, foi usada como conjuntos de genes pré-classificados e convertidos para o formato de lista de classificação de acordo com Jung et al. (Jung et al., 2018). Genes Hallmark do banco de dados de assinaturas moleculares (MsigDB, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) foram usados como conjuntos de genes (Liberzon et al., 2015).

### **Isolamento de células de LLC**

Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes com LLC não tratados. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque e aprovados pelo Comitê de Revisão Institucional da Universidade de Perugia. As características do paciente são descritas na Tabela Suplementar S1. As células de LLC foram isoladas de sangue total usando centrifugação em gradiente de densidade Ficoll seguida por rosetagem de eritrócitos de ovelha. Resumidamente, este procedimento permitiu a separação de células leucêmicas B não rosetadas altamente purificadas ( $93,8 \pm 2,7\%$  CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup>) de células T rosetadas. A pureza das células foi avaliada por análise de citometria de fluxo (EPICS-XLMCL; Beckman Coulter, Fullerton, CA) usando anticorpos monoclonais anti CD45, CD19, CD5, CD11b, CD3 (mAb) em 7AAD negativo (todos da Beckman Coulter). Os casos de

LLC foram caracterizados quanto ao status mutacional IGHV, SF3B1 e MYD88, as principais anormalidades citogenéticas descritas (DÖHNER et al., 2000; GHIA et al., 2007; PATNAIK et al., 2012).

### **Status mutacional de *NOTCH1***

A carga alélica de *NOTCH1* em células de LLC foi determinada por PCR específico de alelo (AS-PCR) e PCR digital (ddPCR) conforme descrito anteriormente (DI IANNI et al., 2018).

### **Cultura de células e tratamento com a curcumina**

Células de LLC colhidas a fresco ou congeladas de forma viável foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% ou 20% de soro humano inativado por calor (FBS, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), L-glutamina 2mM e 100U / ml penicilina / 100µg / ml estreptomicina a 37 ° C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. Para ativar especificamente a sinalização de Notch1, 2x10<sup>6</sup> células / ml foram tratadas com EDTA 0,5 mM por 1 h. As células de LLC foram tratadas com veículo (dimetilsulfóxido) ou curcumina (Sigma-Aldrich) adicionado diretamente ao meio em diferentes momentos.

### **Análise de citometria de fluxo**

As células apoptóticas foram enumeradas por citometria de fluxo em um analisador FACSCalibur (BD Biosciences) após coloração com Anexina-V-APC / Iodeto de Propídio (Immunotech, Beckman Coulter) realizada de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis (AnV- / PI-) ou apoptóticas (An+ / PI- ou AnV+ / PI+) em relação ao controle tratado com veículo. A medição do fluxo de Ca<sup>2+</sup> foi realizada usando o kit de ensaio de cálcio Fluo-4 Direct™ (Life technologies, Thermo Scientific, Eugene, Oregon, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A análise dos dados foi realizada com o software FlowJo versão 10 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, EUA).

## **Western blotting**

A análise de Western blot foi conduzida com protocolos previamente relatados. Em resumo, em cada ponto de tempo, as células foram coletadas e lavadas com PBS. As proteínas de células inteiras foram extraídas por tampão de lise RIPA frio contendo coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich). A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford e fracionada por SDS-PAGE e eletrotransferida para uma membrana de nitrocelulose (Millipore). Os blots foram bloqueados e incubados com anticorpos primários durante a noite a 4°C, e então visualizados com substrato quimioluminescente Supersignal (Thermo Fisher Scientific) em filme de raios-X. A quantificação densitométrica da intensidade do sinal em relação ao controle de carregamento GAPDH foi realizada usando o software Quantity One.

## **Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR)**

O RNA total foi extraído das células usando RNeasy Micro Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Um kit PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Biotechnology Co., Ltd.) foi usado para sintetizar cDNA conforme as instruções do fabricante e RT-PCR foi realizado com PCR Master Mix Power SYBER Green (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido) usando o 7900HT fast Sistema PCR em tempo real (Biosistema Aplicado). Os níveis de expressão relativa do mRNA foram calculados usando o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  e normalizados para GAPDH.

## **Modelo de camundongos Eu-*TCL1***

Os camundongos foram mantidos em condições específicas livres de patógenos e os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê Universitário para o Cuidado Ético e Uso de Animais em Experimentos. Camundongos Eμ-*TCL1* mais velhos (8 meses de idade, CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> (%) periférico =  $5 \pm 3,25$ ) com alta carga de LLC no sangue periférico foram identificados examinando a porcentagem de células de LLC em PBMCs. Estes camundongos foram tratados diariamente por 8 semanas com curcumina (50 mg / kg) administrada

diariamente por injeção intra-peritoneal. O grupo de controle recebeu i.p. injeções com óleo de milho (Sigma-Aldrich), usado como veículo. O desenvolvimento de LLC foi seguido por hemograma completo e medições de citometria de fluxo no sangue periférico com sangramentos mensais. No sacrifício, o peso do rato e o tamanho do baço foram medidos. Sangue periférico, medula óssea, baço, fígado e gânglios linfáticos foram analisados por citometria de fluxo. Os lisados do baço e da medula óssea foram analisados em western blotting. O baço inteiro do veículo e dos camundongos tratados foi injetado em camundongos C57BL / 6 imunocompetentes e eles foram monitorados para CD5<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> (%) periférico por citometria de fluxo e taxa de sobrevivência. A sobrevivência geral dos animais foi estimada pela análise de Kaplan-Meier.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP e as diferenças estatísticas entre os valores médios foram avaliadas usando testes não paramétricos como Wilcoxon para dados pareados e Mann-Whitney para dados não pareados. Os resultados foram indicados como significativos e marcados da seguinte forma: \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

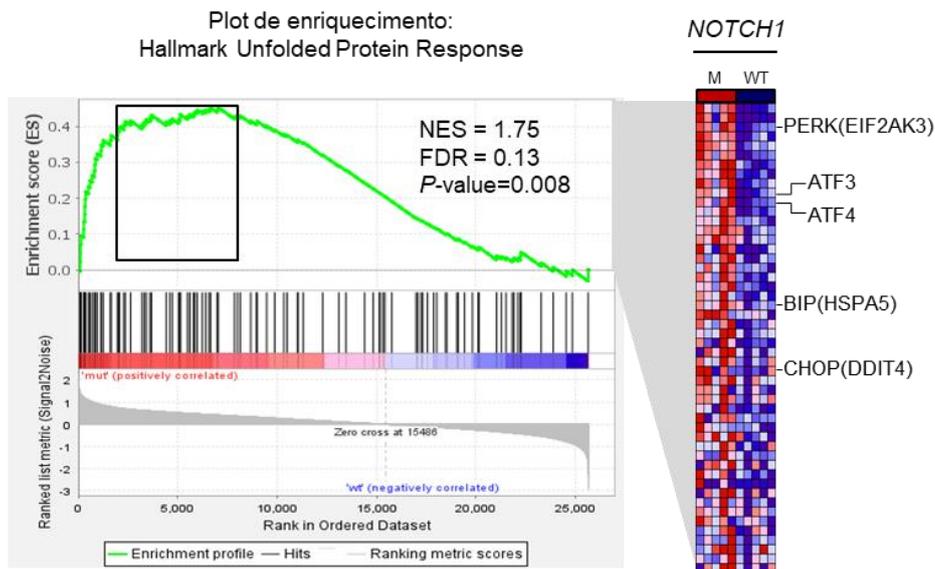
## **RESULTADOS**

### **Células de LLC com *NOTCH1* mutado exibem uma assinatura gênica de estresse de Retículo Endoplasmático e Resposta integrada ao estresse alterada**

Para identificar vias candidatas diferencialmente expressas em amostras de LLC com *NOTCH1* mutado versus tipo selvagem (WT), analisamos o dataset GSE75122 com dados de expressão gênica extraídos do Gene Expression Omnibus (GEO). A análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA) destacou o enriquecimento de "Resposta de Proteína Não Dobrada" (UPR) na expressão gênica de *NOTCH1* mutado versus amostras de LLC WT (FDR = 0,13, FWER = 0,1, P-valor = 0.008) (Figura 1A). Após isso, combinamos este dataset com outros dois, todos

com dados independentes (GSE131114 e GSE92626, Tabela complementar1). Os três conjuntos de dados independentes continham coletivamente 21 amostras mutadas em *NOTCH1* e 31 amostras não mutadas de LLC. Os resultados da análise de cluster de genes expressos diferenciais (DEGs) ajustados para efeitos em lote mostraram uma lista classificada de 620 genes desregulados entre *NOTCH1* mutado em comparação com amostras de LLC WT que eram comuns nos três conjuntos de dados ( $p < 0,05$ ), incluindo 455 suprarregulados e 165 genes regulados negativamente (Tabela complementar 2). A análise da via da ontologia do gene evidenciou que DEGs eram termos significativamente enriquecidos relacionados à função ER, incluindo "localização de proteína na membrana ER", "estabelecimento de localização de proteína em ER", "direcionamento de proteína em ER", "direcionamento de proteína cotranslacional dependente de SRP na membrana" e "UPR mediada por PERK. Como mostrado na figura 1B, destacamos a análise de redes de interação dos genes com a resposta integrada ao estresse (ISR) e processos relacionados com a produção de proteína. No total, esses dados sugerem que o UPR / ISR é uma marca registrada de LLC com mutações em *NOTCH1*.

A



B

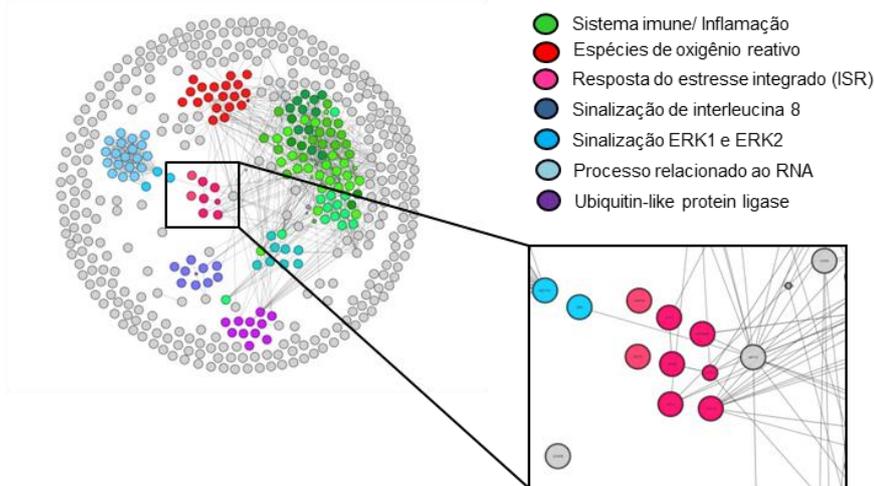


Figura 1. A assinatura de estresse UPR / ISR é enriquecida em células LLC mutadas em *NOTCH1*. (A) Plot de enriquecimento do GSEA para UPR usando amostras do banco de dados GSE75122. (B) Enriquecimento do conjunto gênico baseado na ontologia gênica (processo biológico), com posterior análise da rede (pfp <0,05). As linhas refletem a via de enriquecimento. Os conjuntos de genes são codificados por cores de acordo com sua função ampla.

### Células de LLC mutadas para *NOTCH1* são mais sensíveis ao estresse do RE / UPR / ISR induzido

Para examinar o comportamento das células primárias de LLC sob condições induzidas por estresse UPR / ER, desafiamos células com mutação em *NOTCH1* e

WT com o composto natural curcumina, uma vez que estudos anteriores mostraram sua capacidade de interferir na homeostase do RE em outros tipos de células (LI et al., 2018; MOUSTAPHA et al., 2015). Tratamos as células primárias derivadas de pacientes com LLC (Tabela suplementar 3) com 15  $\mu$ M de curcumina e examinamos a expressão de marcadores associados ao estresse do RE / UPR / ISR selecionados. Curiosamente, os níveis de mRNA dos marcadores *PERK*, *ATF4* e *GADD34* foram significativamente maiores em *NOTCH1* mutado em comparação com células WT sob tratamento com curcumina e normalizado para o respectivo controle DMSO (Figura 2A). A análise de Western blot confirmou a superexpressão da proteína ATF4 e mostrou uma porcentagem aumentada da proteína chaperona de estresse do RE GRP78 / BiP (Fig. 2B). Em seguida, analisamos os efeitos da curcumina na ativação da proteína homóloga da proteína de ligação ao intensificador do fator de transcrição CCAAT (CHOP), que desempenha um papel importante na apoptose induzida pelo estresse. Notavelmente, as células com mutação de *NOTCH1* mostraram um aumento significativo de ambos os níveis de mRNA e proteína de CHOP após 24h de tratamento com curcumina, indicando uma sinalização pró-apoptótica de PERK / ATF4-CHOP mais elevada (Fig. 2C) do que as células WT.

O distúrbio do RE também foi implicado na ativação específica da proteína caspase-4 da membrana do RE, desempenhando um papel essencial na resposta apoptótica ao estresse do RE em LLC (ROSATI et al., 2010, 2012). A análise de WB da caspase-4 mostrou que as células com mutação de *NOTCH1* exibiram um aumento marcante da subunidade ativa de 20 kDa em comparação com as células *NOTCH1* WT após o tratamento com curcumina. A ativação da caspase-4 ocorreu de maneira dependente do tempo, atingindo um pico em 6 horas, seguido por uma redução da forma ativa e da pró-enzima em 24 horas (Fig. 2D). Dado que em células de LLC, a caspase-4 inicia uma cascata envolvendo a ativação da caspase-3 (ROSATI et al., 2010), essencial para a amplificação de feedback de eventos apoptóticos a montante (MCCOMB et al., 2019), analisamos a expressão desta caspase efetora. Apenas células com mutação de *NOTCH1* sob tratamento com curcumina exibiram uma expressão marcada de produtos de caspase-3 clivada que apareceu com uma cinética semelhante à da caspase-4 (Fig. 2D). Além disso, analisamos o produto de clivagem da caspase da proteína BAP31 da membrana do RE na subunidade

BAP20 pró-apoptótica, um comunicador de sinais de apoptose do RE para a mitocôndria e responsável pela sensibilização a apoptose (KOCZIAN et al., 2019). Descobrimos que as células com mutação de *NOTCH1* mostraram níveis aumentados significativos de BAP20 quando comparadas ao DMSO de controle, enquanto as células *NOTCH1* WT tratadas com curcumina mostraram apenas um aumento marginal de BAP20, sugerindo uma interação potencial RE / mitocôndria na presença de mutações em *NOTCH1* na LLC (Fig. 2E). Ao todo, esses dados mostram que a presença da mutação de *NOTCH1* torna as células de LLC incapazes de neutralizar o estresse do RE.

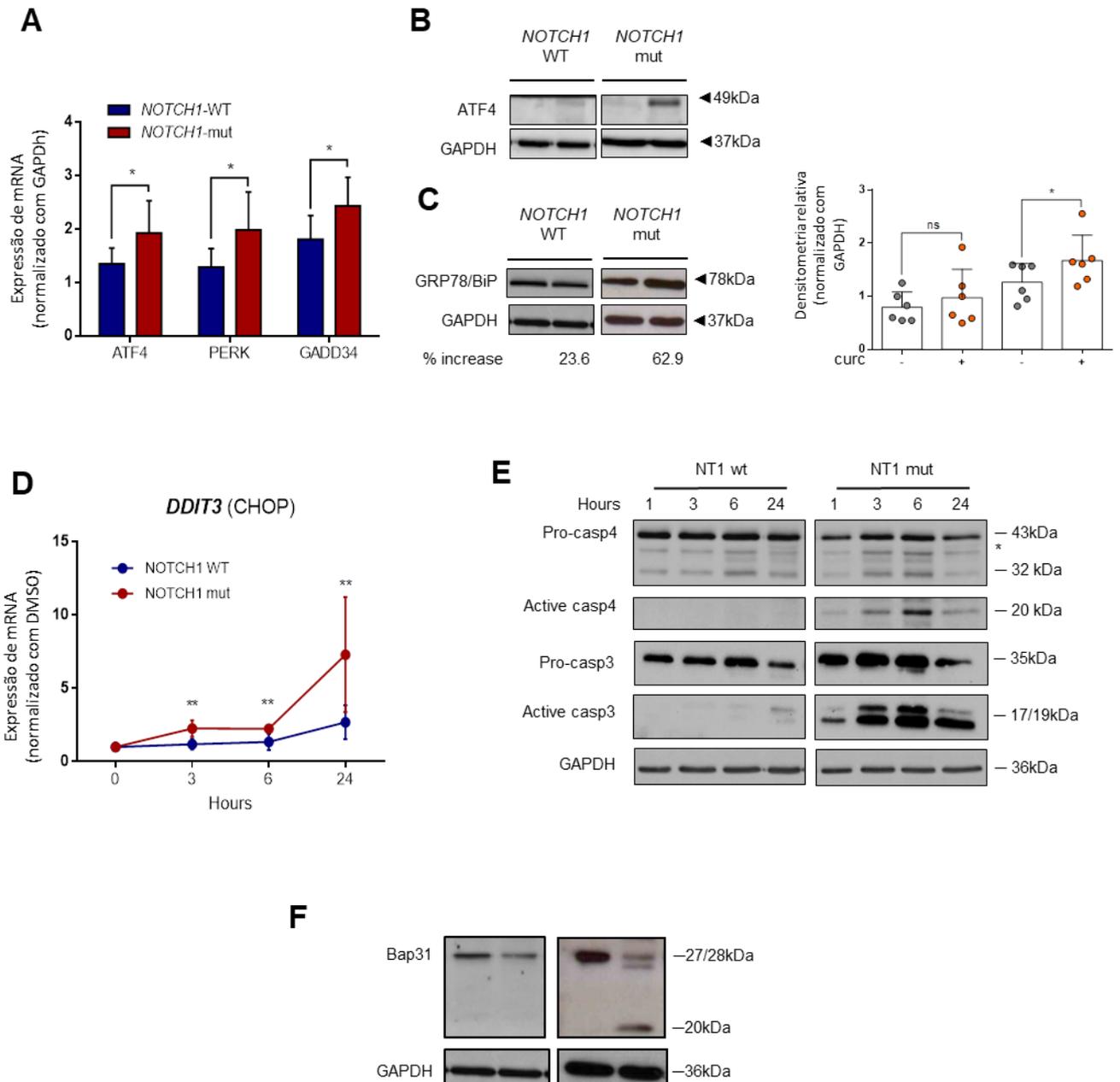


Figura 2. A resposta ao estresse do RE / UPR / ISR difere entre células de LLC mutadas para *NOTCH1* e células WT após o tratamento com curcumina. Células de LLC primárias ( $2 \times 10^6$  células / mL) foram tratadas continuamente com 15  $\mu$ M de curcumina ou veículo (DMSO). (A) Os gráficos de barras mostram que a expressão transcricional de *PERK*, *ATF4* e *GADD34* foi avaliada por PCR em tempo real (n = 5, por grupo), após 6h de incubação. (B) Os lisados de células inteiras de células LLC após 24 horas de tratamento foram coletados e analisados por Western blot para determinar o efeito nos níveis de proteína ATF4 e GRP78 / BiP (C). Os resultados são representativos de n = 5, por grupo. (D) Cinética da expressão gênica de CHOP e proteína após 24h de incubação com curcumina. (E) Cinética da ativação da caspase-4 e caspase 3. (F) Clivagem de Bap31 após 24h de incubação com curcumina. \* P <0,05, \*\* P <0,01.

### Células de LLC mutada para *NOTCH1* mostraram perturbações precoces da homeostase do $Ca^{2+}$

A homeostase do cálcio representa um evento-chave na progressão do estresse do RE. Assim, investigamos a influência desse evento precoce à indução de estresse de RE. A análise de  $Ca^{2+}$  intracelular revelou níveis significativamente aumentados de  $Ca^{2+}$  citosólico após o tratamento com curcumina de células mutadas em *NOTCH1* quando comparados com o controle DMSO, indicando uma forte perturbação na homeostase de  $Ca^{2+}$ . Em células *NOTCH1* WT, a curcumina aumentou apenas marginalmente os níveis de  $Ca^{2+}$  citosólico (Fig.3), e em células com a mutação em *NOTCH1*, houve um aumento significativo de  $Ca^{2+}$  citosólico, o que pode aumentar a sensibilidade à indução de estresse de RE em células de LLC mutadas para *NOTCH1*.

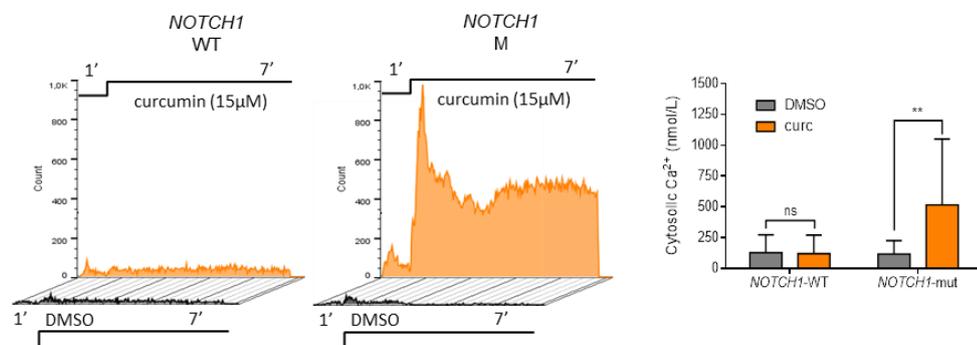


Figura 3. Liberação precoce de  $Ca^{2+}$  após incubação com a curcumina. Células de LLC com mutação de *NOTCH1* e WT foram incubadas com curcumina ou DMSO (controle) após um

minuto de aquisição pelo citômetro. O gráfico mostra a diferença significativa de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático nas células após a incubação com curcumina.

### **A mutação de *NOTCH1* está associada a alta apoptose de células de LLC após indução de estresse de RE**

O estresse do RE pode mediar muitos processos celulares, incluindo a morte celular por apoptose sob estresse severo ou falha de resposta adaptativa. A curcumina pode sensibilizar as células a apoptose devido à sua capacidade de causar estresse no RE (PAE et al., 2007). Para avaliar o efeito citotóxico da curcumina em células leucêmicas, testamos diversas concentrações e examinamos a apoptose em células isoladas de 10 pacientes com LLC. A apoptose avaliada pela dupla positividade da anexina V / PI mostrou um efeito de resposta dependente da concentração após o tratamento com curcumina por 24 h, tendo variabilidade da resposta citotóxica entre as amostras de pacientes. Notavelmente, em amostras mutadas de *NOTCH1*, a curcumina induz um aumento significativo nas células apoptóticas precoce e tardia nas concentrações de 15 e 20  $\mu\text{M}$  em comparação ao controle DMSO, enquanto nas amostras de *NOTCH1* WT, o aumento da apoptose não foi significativo nas concentrações de curcumina testadas (Fig 4A e 4B). Para investigar ainda mais o efeito da curcumina em células de LLC mutadas para *NOTCH1*, estratificamos as amostras mutadas de acordo com um limite de frequência de alelo de 12% (NADEU et al., 2016; ROSATI et al., 2018b) e as subdividimos em alta e baixa carga alélica (*NOTCH1* M high e M low), enquanto as amostras *NOTCH1* com uma razão alélica  $<0,03\%$  foram consideradas *NOTCH1* WT (N = 12). Como mostrado na figura 4C, a taxa de apoptose de *NOTCH1* M low (N = 13) e *NOTCH1* M high (N = 9) exposto à curcumina foi significativamente maior em comparação com as células *NOTCH1* WT (59,2% e 62,3% em comparação com 29,3%, respectivamente) (P = 0.0024 e P = 0.0009, respectivamente). Estes dados indicaram que a resposta induzida ao estresse do RE foi independente da carga mutacional de *NOTCH1*. De acordo com o ensaio de anexina V / PI, a análise de WB do marcador apoptótico PARP mostrou que a curcumina induziu uma clivagem significativa da proteína em células de LLC mutadas para *NOTCH1* em comparação com o controle DMSO (P = 0.03), enquanto que em células *NOTCH1* WT o efeito não foi significativo (Fig.4D). Em conjunto, esses resultados indicam que o status mutacional de *NOTCH1* influencia a

suscetibilidade das células de LLC a apoptose mediada pelo estresse do RE induzida pela curcumina.

Na LLC, o Bcl-2 contribui para a sobrevivência anormal das células leucêmicas e representa um alvo terapêutico para o medicamento anti-Bcl2 Venetoclax, atualmente usado na prática clínica. Assim, testamos os efeitos da curcumina e venetoclax em células de LLC mutadas em *NOTCH1*, demonstrando um aumento significativo da citotoxicidade por combinações de drogas (Figura 4E).

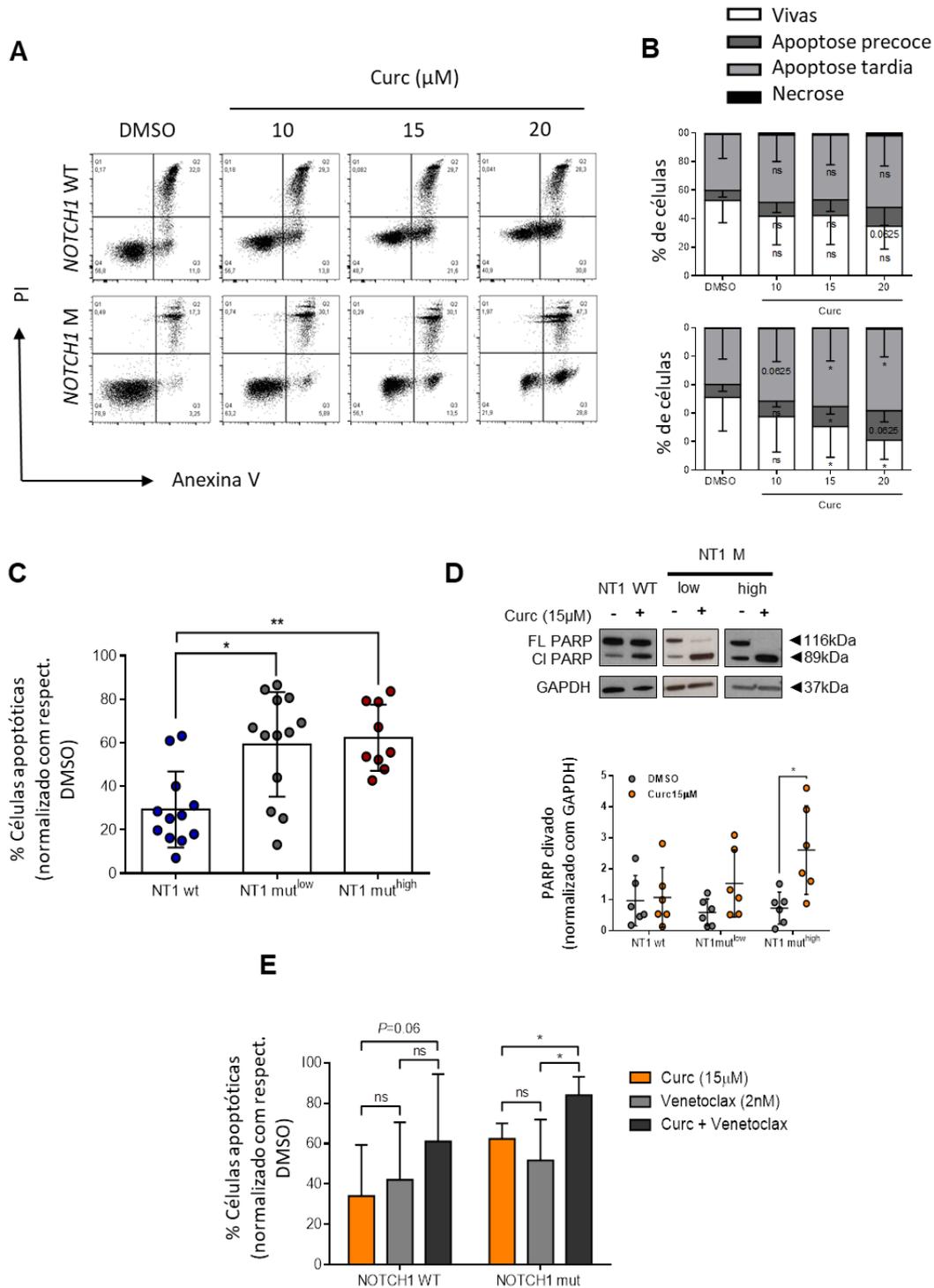


Figura 4. As células primárias LLC NOTCH1 mutadas exibem alta sensibilidade após o tratamento com curcumina. (A) Resposta à dose antileucêmica de curcumina em células LLC primárias avaliadas pelo ensaio de ligação de Anexina-V / PI. As populações que testaram anexina V positiva / PI negativa foram classificadas como células apoptóticas em estágio inicial, e células duplamente positivas foram classificadas como células apoptóticas

em estágio avançado. (B) Gráfico de % de células (vivas, em apoptose precoce e tardia e necrose) após incubação com curcumina por 24h em relação às células incubadas com DMSO. (C) % de células apoptóticas. Os símbolos representam NT1 WT (n = 11) e NT1 M com uma carga de mutação baixa (n = 13) ou alta (n = 16) de células de LLC. (D) Análise de clivagem de PARP por western blot nos diversos subgrupos (NT1-WT, n = 6; NT1-Mlow, n = 6; NT1-Mhigh, n = 6). (E) % de células apoptóticas tratadas com curcumina, venetoclax (2nM) e a combinação de curcumina e venetoclax. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon pareado. \* p <0.05 e \*\* p <0.01.

### **A indução de estresse UPR / ER resultou em regulação negativa de sinalização de NOTCH1 em LLC mutado para *NOTCH1***

Avaliamos se os efeitos antitumorais da indução de estresse do RE / UPR desencadeada pela curcumina estavam associados à inibição de NOTCH1. Para este fim, primeiro medimos a expressão do mRNA de *NOTCH1* em células de LLC primárias após 3h de exposição à curcumina. Os resultados mostraram que a transcrição de *NOTCH1* foi significativamente reduzida em células com mutação *NOTCH1* (P <0.002, n = 7), ao passo que foi apenas marginalmente afetada em células *NOTCH1* WT (Fig. 5A). Em seguida, examinamos o efeito da curcumina na ativação de NOTCH1, realizando a análise de WB da expressão do ICN1 clivado. Conforme mostrado na Figura 5B, os níveis de ICN1 foram significativamente diminuídos em LLC mutado em *NOTCH1*. Para testar ainda mais a capacidade da curcumina de inibir a ativação da sinalização de NOTCH1, analisamos os níveis de genes alvo da transcrição de NOTCH1 após a exposição a este composto. Usando a transcrição reversa quantitativa-PCR, encontramos níveis de mRNA significativamente diminuídos de *HES1* e *DTX1* em LLC mutado em *NOTCH1*. Por outro lado, a curcumina induziu um acúmulo significativo de proteína ICN1, e mRNA de *HES1* e *DTX1* em células *NOTCH1* WT (p = 0.0078) ( Fig. 5B e 5C). Além disso, investigamos o efeito da curcumina em MCL1, um membro Bcl-2 pró-sobrevivência que é conhecido pela associação às respostas UPR e estresse de RE e ativação de sinalização de NOTCH1. A análise de WB mostrou que a curcumina reduziu a expressão de MCL1 em células com mutação de *NOTCH1*, enquanto os níveis são mais elevados em células *NOTCH1* WT em comparação com DMSO de controle (Fig. 5D). Notavelmente, houve uma correlação positiva significativa entre os níveis de ICN1 e MCL1 induzidos pela curcumina (p = 0.0006; Fig. 5E), reforçando a

relação entre a sinalização de NOTCH1 e MCL1 em células de LLC. No geral, esses resultados sugerem um papel para a via NOTCH1 na resistência a apoptose induzida por estresse de RE.

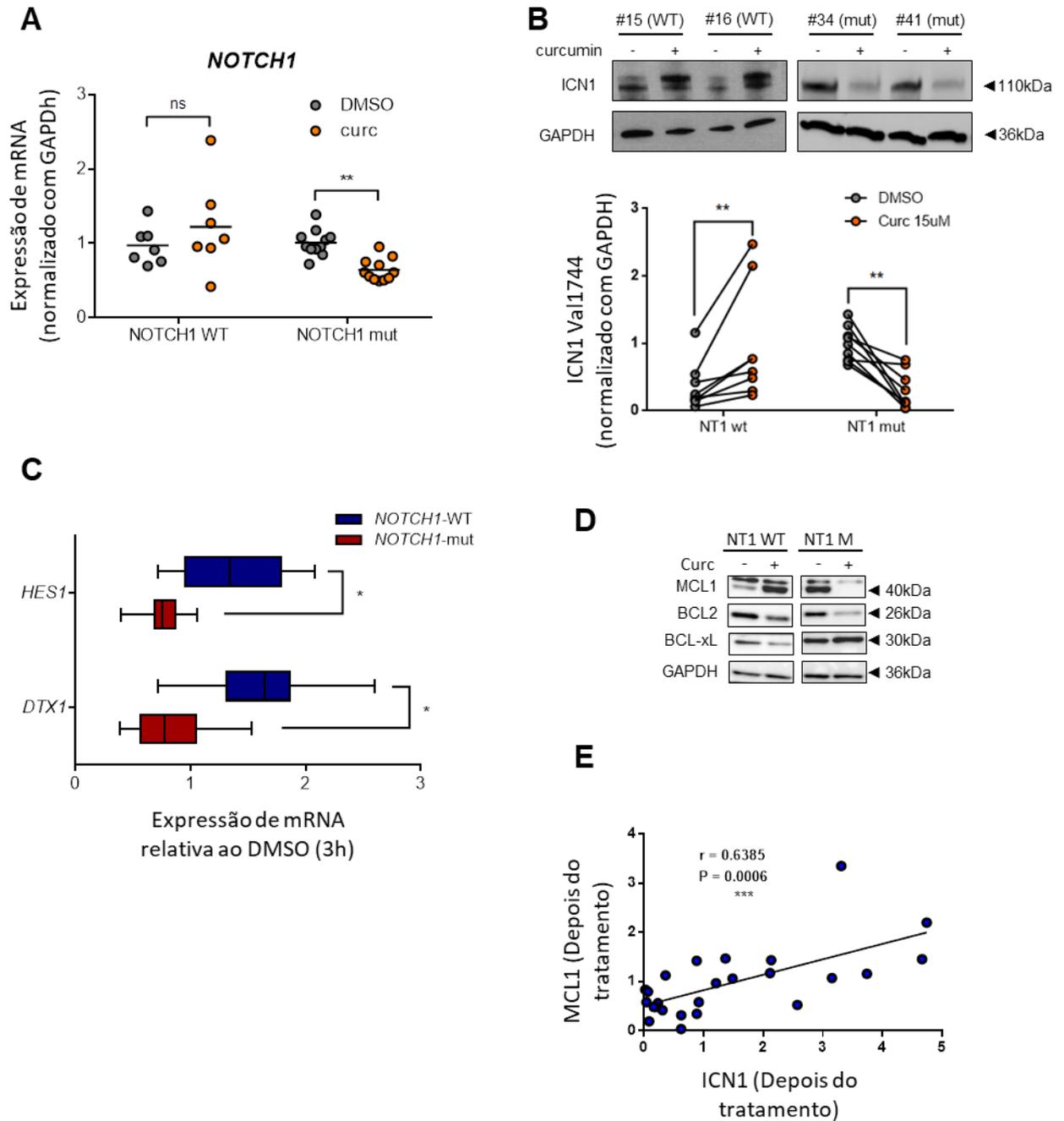


Figura 5. Expressão e ativação de NOTCH1 após cultura in vitro. (A) avaliação qRT-PCR dos níveis de mRNA de *NOTCH1* de células de LLC primárias *NOTCH1*-WT (n = 5) e células de LLC primárias *NOTCH1*-mutadas (n = 7) após 3h de cultura com curcumina (15µM) ou controle de DMSO. (B) Análise de Western blot de ICN1 em lisados celulares totais cultivados com curcumina ou DMSO em *NOTCH1*-WT e células primárias de LLC

mutadas. Gráfico que representa dados cumulativos de quantificação de intensidade de banda de ICN1-WT (n = e -mutado após cultura de 24h com curcumina ou DMSO).

### **A indução de estresse de RE / UPR / ISR desencadeou efeitos antileucêmicos associados à inibição de NOTCH1 em camundongos E $\mu$ -*TCL1***

Os camundongos transgênicos *TCL1* representam um modelo de LLC pré-clínico amplamente usado no qual a resposta ao estresse de RE é ativada de forma aberrante (KRISS et al., 2012). Nestes camundongos, a análise de WB de células CD5<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> revelou uma expressão mais elevada da proteína ICN1 juntamente com níveis incrementados de mRNA dos genes-alvo de NOTCH1: *HES1* e *DTX1* em comparação com células B de baços de ninhada de tipo selvagem (Fig. 6A e B). Para a análise da atividade da curcumina em células B esplênicas de camundongos E $\mu$ -*TCL1*, células B CD19<sup>+</sup> purificadas foram cultivadas com anti-CD40 e IL-4 para estimulação. Após a exposição à curcumina, as células estimuladas apresentaram níveis elevados de ATF4 e CHOP em relação ao controle de DMSO (Fig. 6C). No geral, os camundongos E $\mu$ -*TCL1* imitam as alterações encontradas em células CLL mutadas em *NOTCH1* em pacientes humanos, representando assim uma plataforma adequada para investigar a atividade anti-CLL in vivo da curcumina como indutor de estresse de RE por meio de direcionamento de NOTCH1. Para tanto, camundongos com oito meses de idade foram tratados com injeção intraperitoneal de curcumina ou veículo por 8 semanas e foram submetidos a análises seriadas de sangue periférico. A curcumina evitou o aumento da porcentagem de células leucêmicas CD5<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> que se expandiram progressivamente em camundongos que receberam veículo (Fig. 6D). Os camundongos tratados com curcumina apresentaram dimensões esplênicas reduzidas em comparação com o veículo (Fig. E). Concomitantemente, como mostrado na figura 6F, as células CD5<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> que infiltram a medula óssea e o fígado de camundongos tratados com curcumina foram significativamente reduzidas em comparação com os veículos (n = 4 vs n = 4; *P* <0,05, ambos). Em seguida, analisamos se os efeitos anti-CLL estavam correlacionados a alterações da atividade de NOTCH1 em células leucêmicas BM de camundongos E $\mu$ -*TCL1*. As células CD5<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> classificadas mostraram níveis de proteína ICN1 significativamente mais baixos e uma tendência à expressão reduzida de *HES1* em

camundongos tratados com curcumina em comparação com o veículo (n = 4, P <0,05 e P <0,01, respectivamente, Fig. 6G).

Finalmente, avaliamos os efeitos do tratamento com curcumina na sobrevivência de camundongos Eμ-TCL1. A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier revelou que camundongos tratados apenas com veículo (n = 8) sucumbiram significativamente mais cedo do que camundongos tratados com curcumina (n = 8, P = 0,04, Fig. 6H), demonstrando o potencial da curcumina no manejo de LLC .

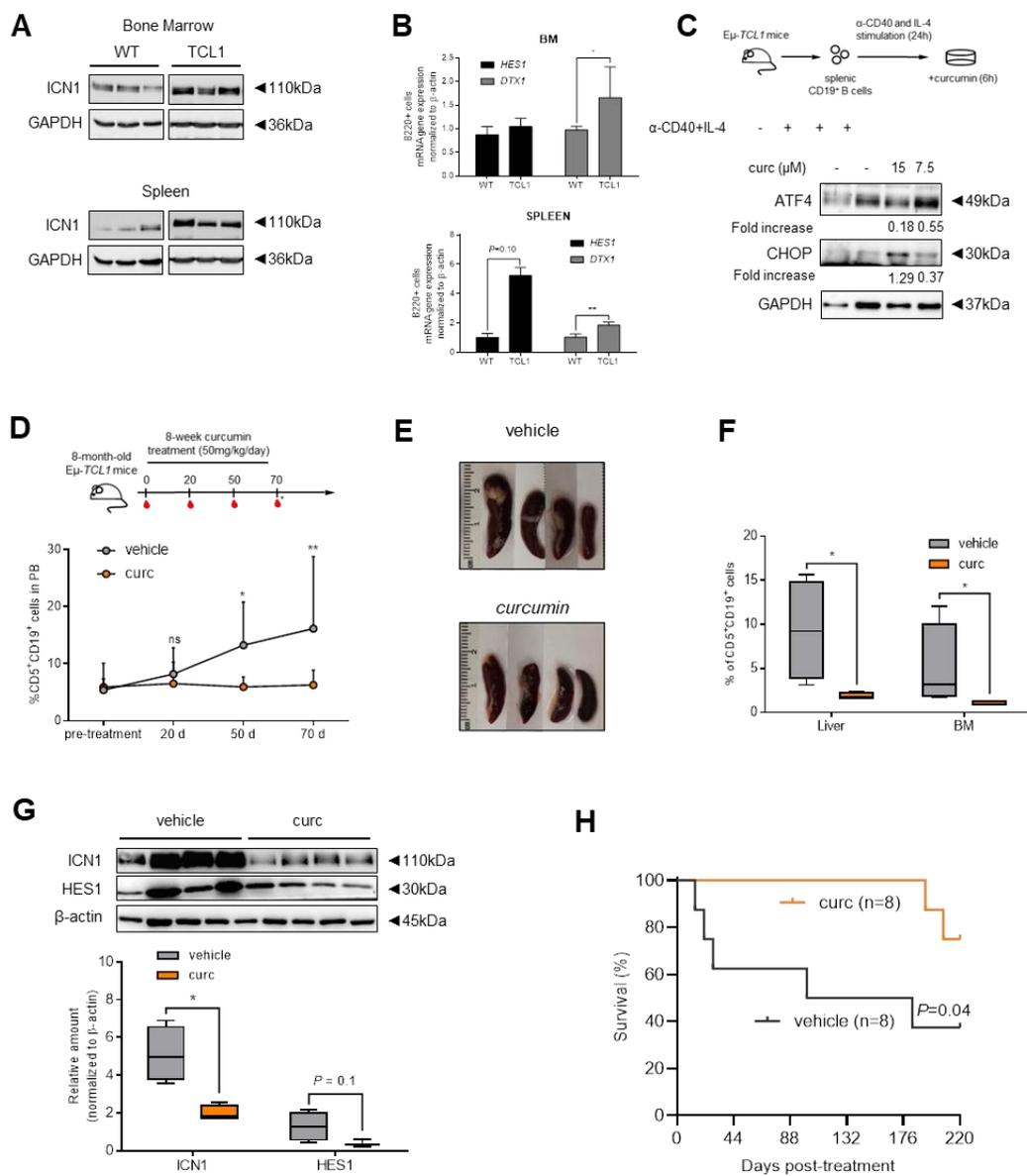


Figura 6. A curcumina suprime o desenvolvimento de células leucêmicas (CD5 + / CD19 +) e reduz a sinalização de NOTCH1 em camundongos Eμ-TCL1. (A e B) Análise de Western

blot de análise de ICN1 e qRT-PCR para HES1 e DTX1 em BM e baços derivados de camundongos WT (n = 3) e E $\mu$ -TCL1 (n = 3). Os resultados mostraram que os níveis de ICN1 e os alvos a jusante do mRNA HES1 e DTX1 foram aumentados no baço E $\mu$ -TCL1 e nos lisados BM em relação ao WT. (C) As células B CD19 + foram estimuladas com CD40 + e IL-4 por 24h e cultivadas com curcumina (15 e 7,5 $\mu$ M) por 6h. A análise de Western blot de ATF4 e CHOP mostrou valores aumentados em células tratadas com curcumina. (D) Camundongos E $\mu$ -TCL1 de oito meses foram injetados intraperitonealmente com curcumina (50mg / kg / dia) dissolvido em veículo (óleo de milho) ou veículo sozinho diariamente por 8 semanas e avaliados de acordo com o esquema descrito em D. Expansão de CD5 + CD19 + as células do sangue periférico (n = 4 por grupo) foram avaliadas por citometria de fluxo nos momentos indicados (teste de Wilcoxon pareado, média  $\pm$  SEM). (E) Dimensões do baço de camundongos tratados com veículo e curcumina (F) Acúmulo de células CD5 + CD19 + no fígado e BM de camundongos E $\mu$ -TCL1 tratados com curcumina ou veículo sozinho (n = 4, por grupo) avaliada por citometria de fluxo após 70 dias após o início do tratamento (conforme representado por um asterisco no esquema). (G) Análise de Western blot de células CD5 + CD19 + classificadas de BM, indicando redução significativa da expressão de ICN1 (n = 4, por grupo) e uma tendência de redução para HES1 (n = 3, por grupo). (H) Gráfico de sobrevivência Kaplan-Meier de camundongos E $\mu$ -TCL1 tratados com curcumina (n = 8) ou veículo sozinho (n = 8) de dois experimentos independentes. \* P <0,05, \*\* P <0,01.

## DISCUSSÃO

Mutações em *NOTCH1* surgiram como uma das alterações somáticas mais frequentes em LLC, que aumentam a estabilidade de ICN1 e desempenham um papel importante na resistência à apoptose e proliferação de células de LLC. Além disso, os pacientes com LLC portadores de mutações em *NOTCH1* mostram uma resistência acentuada à atual imunoterapia. Compreender as alterações que fundamentam a sobrevivência / crescimento anormal de células de LLC com mutação de *NOTCH1* fornece o potencial para desenvolver estratégias terapêuticas eficazes.

Nossa análise de expressão gênica revelou que os genes envolvidos em UPR e estresse de RE foram significativamente enriquecidos nas células de LLC com *NOTCH1* mutado em comparação com *NOTCH1* WT, sugerindo que esta assinatura gênica alterada pode influenciar a sensibilidade das células leucêmicas aos

indutores de estresse de RE, com efeitos na viabilidade celular. Para testar essa hipótese, exploramos o composto natural curcumina, conhecido por provocar estresse no RE e por ter baixa toxicidade e potencial para ser usado no tratamento do câncer. Descobrimos que a curcumina desencadeou a ativação de vários mediadores de estresse de RE / UPR e induziu apoptose em células de LLC. Surpreendentemente, tanto o estresse de RE / UPR e respostas apoptóticas foram muito mais marcadas em *NOTCH1* mutado em comparação com *NOTCH1* WT, sugerindo que a presença de mutação em *NOTCH1* torna as células de LLC mais suscetíveis à apoptose desencadeada por estresse do RE. Especificamente, a curcumina aumentou a ativação de duas vias importantes pró-apoptóticas associadas ao estresse de RE, o eixo PERK-ATF4-CHOP (NG; CHNG; KHAN, 2011) e a cascata da caspase4 / caspase3. Além de ativar as vias pró-apoptóticas, a curcumina também aumentou a expressão do componente protetor UPR GRP78 / BiP. É bem conhecido que GRP78 / BiP, na fase inicial da resposta ao estresse de RE lida com perturbações no RE para restaurar o funcionamento normal do RE, mas quando o estresse é severo ou prolongado, ele evolui para um programa de morte celular. A possibilidade de que a apoptose de células de LLC induzida por curcumina envolva a interação RE-mitocôndria é apoiada por dados que mostram, particularmente em células mutadas em *NOTCH1*, que a proteína de membrana do RE BAP31 é clivada na pró-apoptótica BAP20, conhecida por desencadear sinais dependentes de  $Ca^{2+}$  para mitocôndrias (Breckenridge DG, Shore GC 2003).

Nossos resultados também mostraram que o estresse de RE induzido pela curcumina envolveu um aumento nos níveis de  $Ca^{2+}$  citosólico, que de forma semelhante aos outros efeitos induzidos pela curcumina, foi mais pronunciado em *NOTCH1* mutado em comparação com células *NOTCH1* WT. Foi demonstrado em outras células tumorais que a curcumina perturba a homeostase do  $Ca^{2+}$  intracelular induzindo a liberação de  $Ca^{2+}$  do RE para o citoplasma, onde o  $Ca^{2+}$  pode propagar sinais apoptóticos para a mitocôndria (Ludivine Walter 2005). Um mecanismo adicional pelo qual a curcumina pode perturbar a homeostase do  $Ca^{2+}$  induzindo apoptose dependente do estresse do RE é a inibição do transporte de  $Ca^{2+}$  dependente de SERCA para o RE (Lu Wang Molecular Cancer therapeutics 2011). Curiosamente, neste contexto, foi recentemente demonstrado que o novo modulador SERCA seletivo CAD204520 teve um efeito antileucêmico mais forte em linfoblastos

T-ALL portadores de mutações nos domínios HD e PEST em *NOTCH1* em comparação com *NOTCH1* WT, sugerindo o potencial da inibição de SERCA como um agente terapêutico contra câncer dependente de NOTCH1 (Marchesini et al., 2020). Além disso, estudos de cinética indicaram que os efeitos da curcumina nas vias de estresse de RE / UPR foram acompanhados por uma inibição rápida do proteassoma que pode contribuir para o estresse de RE, como mostrado em outras doenças malignas.

Notavelmente, neste estudo, mostramos que os níveis elevados de apoptose induzidos pela curcumina em células de LLC mutadas com *NOTCH1* foram associados a uma forte redução nos níveis da proteína ICN1 em comparação com o DMSO de controle. Mesmo os níveis de mRNA de *NOTCH1* e de seu alvo *HES1* e *DTX*, bem como a expressão da proteína Mcl1, conhecida por ser regulada por *NOTCH1* em células de LLC, foram reduzidos pela curcumina. Por outro lado, em células *NOTCH1* WT, a curcumina induziu um aumento da expressão da proteína ICN1 e Mcl-1 e do mRNA *HES1* ou *DTX*, e apenas afetou marginalmente o transcrito de *NOTCH1*. O efeito diferente da curcumina na expressão da proteína ICN1 mutada e WT poderia depender da inibição da atividade do proteassoma induzida pela curcumina em células de LLC. O ICN1-WT é uma proteína com meia-vida curta rapidamente degradada pelo proteassoma e, portanto, pode se acumular após a inibição do proteassoma pela curcumina. A ICN1 mutada é uma proteína mais estável devido à falta do domínio PEST e, portanto, pode não ser influenciada pela inibição do proteassoma e regulada pela curcumina por meio de um mecanismo diferente. Um mecanismo que pode contribuir para reduzir a expressão de ICN1 mutado pode ser uma redução da transcrição do gene, como sugerido pelos níveis diminuídos de mRNA de *NOTCH1*.

Além disso, sob condições de estresse de RE sustentado, o UPR desencadeia a apoptose em parte por meio da regulação transcricional da família Bcl-2. As células tratadas com curcumina apresentaram redução nos níveis de proteínas da família Bcl-2, efeito descrito em células de LLC e outros cânceres. No entanto, a expressão de Mcl-1 foi reduzida em LLC com mutação de *NOTCH1* e aumentada em células WT, um mecanismo de regulação de NOTCH1 previamente descrito por nosso grupo (FALCO et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a ativação de ATF4 medeia o

acúmulo indesejado de Mcl-1 pela inibição do proteassoma, e sua eliminação foi paralela à regulação negativa de Mcl-1 (HU et al., 2012). Além disso, o estresse de RE sensibiliza as células à morte por meio da regulação negativa de Mcl-1 e da regulação positiva dependente de PERK do receptor de morte TRAIL (ROSA; MAHO; ABELARDO, 2012). Ao direcionar o Bcl-2, o tratamento de combinação de venetoclax e curcumina foi considerado altamente sinérgico em células mutadas *NOTCH1* e células *NOTCH1* WT parecem ser menos sensíveis para drogas combinadas. Essa heterogeneidade de resposta pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo mecanismo de resistência ao venetoclax mediado pelo acúmulo de Mcl-1.

A superexpressão crônica de TCL1 em camundongos E $\mu$ -TCL1 ativa a resposta ao estresse ER e apóia a progressão maligna de CLL (KRISS et al., 2012). A ativação diferente da sinalização de NOTCH1 em E $\mu$ -TCL1 em relação aos camundongos WT também pode ser parcialmente explicada pela indução dessa resposta ao estresse. Finalmente, a administração de curcumina em E $\mu$ -TCL1 está relacionada com a diminuição da porcentagem de células CD5 + / CD19 + do sangue periférico e órgãos linfoides e com a taxa de sobrevivência prolongada. Assim, o direcionamento da sinalização ISR e NOTCH1 deve fornecer orientação adicional sobre a terapêutica anticâncer e a curcumina, sendo um componente natural do produto alimentar, poderia se tornar um adjuvante para os agentes terapêuticos atualmente disponíveis para CLL se sua utilidade e utilidade terapêutica pudessem ser estabelecidas por meio de procedimentos pré-clínicos adicionais e estudos clínicos.

## REFERENCIAS

- ACIOLE, G. G.; BATISTA, L. H. Promoção da saúde e prevenção de incapacidades funcionais dos idosos na estratégia de saúde da família. *Saúde debate*, v. 37, n. 96, p. 10–19, 2013.
- ANGELO, L. S.; KURZROCK, R. Turmeric and Green Tea: A Recipe for the Treatment of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 4, p. 1123–1125, 15 fev. 2009.

- ARDLIE, K. G. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, v. 348, n. 6235, p. 648–660, 8 maio 2015.
- ARRUGA, F.; VAISITTI, T.; DEAGLIO, S. The NOTCH pathway and its mutations in mature B cell malignancies *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 26 nov. 2018. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 21 abr. 2021
- BANDARANAYAKE, T.; SHAW, A. C. Host Resistance and Immune Aging. 2016.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.
- BEARD, J. R. et al. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet (London, England)*, v. 387, n. 10033, p. 2145–2154, 21 maio 2016.
- BERRY, L. W.; WESTLUND, B.; SCHEDL, T. Germ-line tumor formation caused by activation of *glp-1*, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development (Cambridge, England)*, v. 124, n. 4, p. 925–36, fev. 1997.
- BI, P. et al. Notch signaling regulates adipose browning and energy metabolism. *Nature Medicine*, v. 20, n. 8, p. 911–918, 2014a.
- BI, P. et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. *Nature Medicine* 2014 20:8, v. 20, n. 8, p. 911–918, 20 jul. 2014b.
- BOUCHER, J. M. et al. Pathological Conversion of Mouse Perivascular Adipose Tissue by Notch Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 40, p. 2227–2243, 2020.
- BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 1 set. 2012.
- BRIDE, L. et al. TCF7L2 rs7903146 polymorphism association with diabetes and obesity in an elderly cohort from Brazil. *PeerJ*, v. 9, p. e11349, 5 maio 2021.
- BRUCE, B.; JOEL W, C.; JONATHAN L, T. Climate change, human health, and epidemiological transition. *Preventive medicine*, v. 70, p. 69–75, 1 jan. 2015.
- BULL, L. Genetics, Mutations, and Polymorphisms. 2013.
- C, A. et al. Caloric restriction in lean and obese strains of laboratory rat: effects on body composition, metabolism, growth and overall health. *Experimental physiology*, v. 100, n. 11, p. 1280–1297, 1 nov. 2015.

- CAO, Y.-W. et al. Notch1 single nucleotide polymorphism rs3124591 is associated with the risk of development of invasive ductal breast carcinoma in a Chinese population. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 7, n. 7, p. 4286–94, 2014.
- CAPACCIONE, K. M.; PINE, S. R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 7, p. 1420–1430, 1 jul. 2013.
- CARSTEN T, H.; FIORAN W, K. Adipose tissue browning in mice and humans. *The Journal of endocrinology*, v. 241, n. 3, p. R97–R109, 2019.
- CASTRO, M. C. et al. Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. *Nature Medicine*, jun. 2021.
- CORMIER-DAIRE, V. et al. Cryptic terminal deletion of chromosome 9q34: A novel cause of syndromic obesity in childhood? *Journal of Medical Genetics*, v. 40, n. 4, p. 300–303, 2003.
- COYLE, P. K. Pharmacogenetic Biomarkers to Predict Treatment Response in Multiple Sclerosis: Current and Future Perspectives. *Multiple Sclerosis International*, v. 2017, p. 1–10, 2017.
- CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D. A. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annual Review of Medicine*, v. 56, n. 1, fev. 2005.
- DEREK M, H.; N, B. Contribution of adipose tissue to health span and longevity. *Interdisciplinary topics in gerontology*, v. 37, p. 1–19, 2010.
- DING, E. et al. Notch polymorphisms associated with sensitivity of noise induced hearing loss among Chinese textile factory workers. *BMC Medical Genetics* 2018 19:1, v. 19, n. 1, p. 1–9, 14 set. 2018a.
- DING, L. et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell*, v. 173, p. 305–320, 2018b.
- DUARTE, Y. A. DE O. et al. Fragilidade em idosos no município de São Paulo: prevalência e fatores associados. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology*, v. 21Suppl 02, n. Suppl 2, p. e180021, 2019.
- ELLEGREN, H.; GALTIER, N. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics* 2016 17:7, v. 17, n. 7, p. 422–433, 6 jun. 2016.
- FABBRI, G. et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 14, p. E2911–E2919, 4 abr. 2017.

- FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology* 2018 15:9, v. 15, n. 9, p. 505–522, 31 jul. 2018.
- FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 216–229, abr. 2006.
- FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 908, p. 244–254, 2000.
- FRANCESCO, P. et al. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages. *Redox biology*, v. 15, p. 170–181, 1 maio 2018.
- FRE, S. et al. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. *Experimental Cell Research*, v. 317, n. 19, p. 2740–2747, 15 nov. 2011.
- GABRIEL, S. B. et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 21 jun. 2002.
- GARG, V. et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*, v. 437, n. 7056, p. 270–274, 17 set. 2005.
- GONÇALVES, M. V. et al. Chronic lymphocytic leukemia in Brazil: A retrospective analysis of 1903 cases. *American Journal of Hematology*, v. 92, n. 8, p. E171–E173, ago. 2017.
- GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, v. 23, n. 5, p. 644–645, 1 mar. 2007.
- GREENWALD, I.; KOVALL, R. Notch signaling: genetics and structure. *WormBook*, p. 1–28, 17 jan. 2013.
- GUO, L. et al. rVarBase: An updated database for regulatory features of human variants. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D888–D893, 2016.
- H, Z.; R, P.; MH, G. Haplotype analysis in population genetics and association studies. *Pharmacogenomics*, v. 4, n. 2, p. 171–178, mar. 2003.
- HALASCHEK-WIENER, J. et al. Genetic Variation in Healthy Oldest-Old. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6641, 14 ago. 2009.

- HALLEK, M. et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, v. 131, n. 25, p. 2745–2760, 21 jun. 2018.
- HARMAN, D. The aging process. *Basic life sciences*, v. 49, p. 1057–65, 1988.
- HAYNES, L. Aging of the Immune System: Research Challenges to Enhance the Health Span of Older Adults. *Frontiers in Aging*, v. 0, p. 2, 15 out. 2020.
- HÖFELMANN, D. A. et al. Chronic diseases and socioeconomic inequalities in quality of life among Brazilian adults: findings from a population-based study in Southern Brazil. *European Journal of Public Health*, v. 28, n. 4, p. 603–610, 1 ago. 2018.
- HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 15 maio 2013.
- HUNTER, D. J.; REDDY, K. S. Noncommunicable Diseases. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1109345>, v. 369, n. 14, p. 1336–1343, 2 out. 2013.
- IANNI, M. DI et al. A new genetic lesion in B-CLL: A NOTCH1 PEST domain mutation *British Journal of Haematology*, 2009.
- IBGE. IBGE | Projeção da população. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- ISMAIL, S.; ESSAWI, M. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, v. 1, n. 2, p. 57–63, jul. 2012.
- JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Frontiers in Public Health*, v. 5, 11 dez. 2017.
- JEREMY D, W. Sarcopenia in older adults. *Current opinion in rheumatology*, v. 24, n. 6, p. 623–627, nov. 2012.
- KENNEDY, B. K. et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, v. 159, n. 4, p. 709–13, 6 nov. 2014.
- KIRSI A, V. The rediscovery of BAT in adult humans using imaging. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, v. 30, n. 4, p. 471–477, 1 ago. 2016.
- KOCAL, G. C.; BASKIN, Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. *Genetic Polymorphisms*, 6 set. 2017.

- KOCZIAN, F. et al. Targeting the endoplasmic reticulum-mitochondria interface sensitizes leukemia cells to cytostatics. *Haematologica*, v. 104, n. 3, p. 546–555, 28 fev. 2019.
- KRISS, C. L. et al. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. *Blood*, v. 120, n. 5, p. 1027–1038, 2 ago. 2012.
- KUMAR, V.; SHANBHAG, L. Curcumin in chronic lymphocytic leukemia- A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Shanbhag VKL*, 2017.
- KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* Taylor and Francis Ltd, , 2 set. 2019.
- KUROOKA, H.; KURODA, K.; HONJO, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse Notch1 intracellular region. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 23, p. 5448–5455, 1 dez. 1998.
- LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 8, p. 794–798, 25 ago. 2016.
- LAURA M, P. et al. “Adipaging”: ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *The Journal of physiology*, v. 594, n. 12, p. 3187–3207, 15 jun. 2016.
- LI, L. J. et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on autophagy and apoptosis of human leukemia cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 17, n. 6, p. 7886–7892, 1 jun. 2018.
- LIU, J. et al. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 92, n. C, p. 367–409, 1 jan. 2010.
- LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015 518:7538, v. 518, n. 7538, p. 197–206, 11 fev. 2015.
- LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. *Cell*, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.
- MA, M. et al. Chronic non-communicable diseases and COVID-19: EPICOVID-19 Brazil results. *Revista de saude publica*, v. 55, p. 38, 2021.

MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases Hindorff5,. *Nature*, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 2009.

MARIE, N. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)*, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

MATUTES, E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, v. 8, n. 10, p. 1640–5, out. 1994.

MCBRIDE, K. L. et al. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. *Human Molecular Genetics*, v. 17, n. 18, p. 2886–2893, 15 set. 2008.

MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. *Science Advances*, v. 5, n. 7, p. 9433–9464, 31 jul. 2019.

MICHAEL B, S. et al. Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. *Physiology (Bethesda, Md.)*, v. 32, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2017.

MOHR, O. L. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*, v. 4, n. 3, p. 275–82, maio 1919.

MOUSTAPHA, A. et al. Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. *Cell Death Discovery*, v. 1, n. 1, p. 15017, 26 dez. 2015.

MULLEN, S. A. et al. A neurologist's guide to genome-wide association studies. *Neurology*, v. 72, n. 6, p. 558–565, 10 fev. 2009.

NADEU, F. et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 127, n. 17, p. 2122–2130, 2016.

NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Human Mutation*, v. 38, n. 7, p. 751–763, jul. 2017.

NASLAVSKY, M. S. et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil) *bioRxiv*, , 16 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.09.15.298026>>. Acesso em: 26 abr. 2021

- NG, A. P. P.; CHNG, W. J.; KHAN, M. Curcumin sensitizes acute promyelocytic leukemia cells to unfolded protein response-induced apoptosis by blocking the loss of misfolded N-CoR protein. *Molecular Cancer Research*, v. 9, n. 7, p. 878–888, jul. 2011.
- NICCOLI, T.; PARTRIDGE, L. Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology*, v. 22, n. 17, p. R741–R752, 11 set. 2012.
- NYAGA, D. M. et al. Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Genetic Variants Contribute to Overlapping Immune Regulatory Networks. *Frontiers in Genetics*, v. 0, p. 535, 21 nov. 2018.
- PAE, H. O. et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 353, n. 4, p. 1040–1045, 23 fev. 2007.
- PHAN, L. et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa)>.
- PUENTE, X. S. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, v. 475, n. 7354, p. 101–105, 5 jul. 2011.
- PUENTE, X. S. et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, v. 526, n. 7574, p. 519–524, 22 out. 2015.
- QUAN, X. et al. Single nucleotide polymorphism rs3124599 in Notch1 is associated with the risk of lung cancer in northeast Chinese non-smoking females. *Oncotarget*, v. 8, n. 19, p. 31180, 2017.
- RACHEL, N. Preventing and managing chronic diseases. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 364, 31 jan. 2019.
- RADHIKA, M. et al. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. *Aging cell*, v. 7, n. 3, p. 438–440, jun. 2008.
- RAI, K. R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American Journal of Hematology*, v. 91, n. 3, p. 330–340, 1 mar. 2016.
- REN, Y. et al. Curcumin relieves paraquat-induced lung injury through inhibiting the thioredoxin interacting protein/NLR pyrin domain containing 3-mediated inflammatory pathway. *Molecular medicine reports*, v. 20, n. 6, p. 5032–5040, 1 dez. 2019.
- REXFORD S, A. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature medicine*, v. 15, n. 9, p. 996–997, set. 2009.

- RIBEIRO, D. R. et al. PREVALÊNCIA DE DIABETES MELLITUS E HIPERTENSÃO EM IDOSOS. *Revista Artigos.Com*, v. 14, p. 2–7, 2020.
- RICHARD MATTHEW, D. et al. Prevalence and incidence of sarcopenia in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, v. 8, n. 2, p. 229–237, 1 abr. 2017.
- ROSATI, E. et al. Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. *Blood*, v. 116, n. 15, p. 2713–2723, 14 out. 2010.
- ROSATI, E. et al.  $\gamma$ -Secretase inhibitor I induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress increase and notch down-regulation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 000, 2012.
- ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in oncology*, v. 8, p. 229, 2018a.
- ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Frontiers in oncology*, v. 8, p. 229, 2018b.
- ROSS, D. A.; RAO, P. K.; KADESCH, T. Dual Roles for the Notch Target Gene Hes-1 in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 8, p. 3505–3513, 15 abr. 2004.
- SANGMI, K. et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 18, n. 3, p. 816–820, mar. 2009.
- SCHAID, D. J. et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *American Journal of Human Genetics*, v. 70, n. 2, p. 425–434, 1 fev. 2002.
- SCOTT, R. A. et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes*, v. 66, n. 11, p. 2888–2902, nov. 2017.
- SHAH, P. A. et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2677, 2020.
- SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*, v. 97, p. 1235–1294, 2017.
- SIMÕES, C. C. S. Breve histórico do processo demográfico. Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI, 2016.

- SPORTOLETTI, P. et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *British Journal of Haematology* Br J Haematol, , nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813007/>>. Acesso em: 21 abr. 2021
- STEINE, I. M. et al. Implication of NOTCH1 gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims. *Translational Psychiatry*, v. 6, p. 1–9, 2016.
- TAM, V. et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, v. 20, n. 8, p. 467–484, 1 ago. 2019.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A haplotype map of the human genome. *Nature*, v. 437, n. 7063, p. 1299–1320, out. 2005.
- TING, L. et al. Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, v. 20, n. 6, p. 813–825, 2011.
- TIZHONG, S. et al. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *Journal of lipid research*, v. 54, n. 8, p. 2214–2224, ago. 2013.
- VASTRAD, B. et al. Bioinformatics Analysis of Key Genes and Pathways for Obesity Associated Type 2 Diabetes Mellitus as a Therapeutic Target. *bioRxiv*, p. 2020.12.25.424383, 27 dez. 2020.
- WALL, J. D.; PRITCHARD, J. K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, v. 4, n. 8, p. 587–597, 1 ago. 2003.
- WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D877–D881, 2016.
- WHITEHEAD, A. et al. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. *Nature Communications* 2021 12:1, v. 12, n. 1, p. 1–21, 26 mar. 2021.
- WHO. Obesity and overweight. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 29 jul. 2021.
- WHO. Noncommunicable diseases. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 26 ago. 2021.
- WILD, P. S. et al. Large-scale genome-wide analysis identifies genetic variants associated with cardiac structure and function. *Journal of Clinical Investigation*, v. 127, n. 5, p. 1798–1812, 10 abr. 2017.

WRIGHT, A. F. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. Encyclopedia of Life Sciences, 23 set. 2005.

YAMAMOTO, S.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. Introduction to Notch Signaling. In: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). [s.l: s.n.]. v. 1187p. 1–14.

YANG, S.-M. et al. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? Blood Reviews, v. 29, n. 3, p. 205–213, 1 maio 2015.

ZHANG, M. et al. Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? Cancer Medicine, v. 5, n. 8, p. 2048, 1 ago. 2016.

ZOICO, E. et al. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. Frontiers in Endocrinology, v. 0, n. JUN, p. 368, 2019.

ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. Nature protocols, v. 2, n. 10, p. 2492, 2007.

## DADOS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Características dos indivíduos estudados incluídos na análise bioinformática.

<b>No. Acesso GEO</b>	<b>Amostras</b>	<b>NOTCH1 M*/WT</b>	<b>Tecido</b>	<b>Plataforma</b>
GSE92626	n = 57	10/12	Sangue periférico	Illumina HiSeq 2500
GSE75122	n = 10	5/5	Sangue periférico	Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F Agilent-039494 SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarray 039381
GSE137024	n = 28	6/13	Sangue periférico	039381

GEO: Gene Expression Omnibus

Tabela suplementar 2. Genes diferencialmente expressos nos diversos estudos (pfp<0.05)

<b>Genes supregulados</b>		<b>Genes subregulados</b>	
<b>Genes</b>	<b>pfp</b>	<b>Genes</b>	<b>pfp</b>

ACSL1	0,011	AES	0,001
ACSL6	0,036	AKAP2	0,036
ACSM3	0,025	APOD	0,000
ACTB	0,001	ARF1	0,041
ACTG1	0,001	BCAS4	0,029
ADAM8	0,001	BCL2	0,004
ADCY9	0,010	C11orf80	0,043
AGPAT5	0,033	C6orf105	0,004
AHR	0,021	CABLES1	0,003
AIF1	0,006	CACNB2	0,017
AMICA1	0,014	CAMK2D	0,029
ANGPT2	0,036	CCND3	0,015
ANK3	0,022	CD200	0,003
ANKRD13A	0,015	CD22	0,011
ANKRD55	0,008	CD37	0,000
ANXA1	0,002	CD52	0,000
ANXA3	0,021	CD53	0,036
AOAH	0,025	CD79A	0,006
APOBEC3A	0,011	CD79B	0,000
AQP9	0,017	CD81	0,010
ARG1	0,033	CD82	0,000
ARHGAP4	0,023	CD83	0,026
ARHGDIB	0,000	CIRBP	0,001
ARHGEF11	0,046	CNTNAP2	0,002
ARPC2	0,017	COCH	0,002
ARPC3	0,004	COL9A2	0,001
ARRB1	0,028	CPNE5	0,037
ARRB2	0,024	CPSF1	0,015
ARRDC3	0,011	CRIP1	0,008
ARRDC4	0,001	CRIP2	0,021
ASCL2	0,041	CRIP3	0,041
ASGR2	0,037	CTLA4	0,000
ASNS	0,046	CTSH	0,005
ATF4	0,024	CXCR4	0,000
ATG16L2	0,006	CYBASC3	0,009
ATP5B	0,016	DLGAP4	0,038
ATP5E	0,022	DMRTA1	0,002
ATP5G2	0,037	EEF2	0,001
AXIN2	0,046	EIF1B	0,031
B2M	0,000	ENPP2	0,001
B3GNT5	0,029	ETS1	0,004
BAIAP3	0,033	FAIM3	0,000
BATF2	0,011	FAM129C	0,000
BAZ2A	0,009	FAU	0,019
BCL11B	0,014	FCER2	0,000
BCL7A	0,013	FCGBP	0,049
BEST1	0,017	FCRL1	0,000
BHLHE40	0,016	FCRL2	0,000
BMX	0,022	FCRL3	0,000
BPI	0,035	FCRL5	0,038
BRP44L	0,034	FCRLA	0,002
BST1	0,039	FMOD	0,000
BTBD11	0,011	FTL	0,032
BTNL3	0,005	GLTSCR2	0,002

---

C10orf54	0,039	GNAS	0,007
C13orf15	0,025	GNB2L1	0,011
C15orf48	0,005	GRB2	0,028
C1orf21	0,043	GSTM2	0,033
C1orf228	0,016	GTSF1L	0,041
C1orf38	0,001	H1FX	0,006
C20orf24	0,047	HDAC9	0,000
C5AR1	0,014	HLA-A	0,000
C9orf47	0,042	HLA-DMA	0,004
CACNG6	0,038	HLA-DOB	0,043
CAMP	0,017	HLA-DQA1	0,001
CASP1	0,049	HLA-DQA2	0,002
CCL2	0,016	HLA-DQB1	0,001
CCL3	0,007	HLA-DQB2	0,002
CCL4	0,009	HLA-DRB5	0,004
CCL5	0,003	HLA-DRB6	0,002
CCNJL	0,001	HLA-E	0,004
CCR2	0,043	ID3	0,006
CCR3	0,007	IGFBP4	0,001
CCT2	0,049	IGJ	0,002
CD14	0,000	IL2RG	0,043
CD160	0,029	IL4R	0,000
CD163	0,030	JUN	0,003
CD2	0,032	KCNN4	0,000
CD247	0,021	KIAA0040	0,034
CD27	0,007	LAPTM5	0,000
CD28	0,020	LENG8	0,005
CD300LF	0,032	LOC401847	0,003
CD33	0,025	LYZL4	0,022
CD36	0,001	MMP17	0,023
CD3D	0,005	MS4A1	0,006
CD3E	0,029	MYL9	0,002
CD3G	0,024	NPTX1	0,046
CD63	0,007	NSMCE1	0,044
CD69	0,003	P2RY14	0,000
CD74	0,000	PDGFD	0,002
CD8A	0,020	PELI1	0,015
CD8B	0,003	PHYHD1	0,008
CD93	0,006	PKIG	0,001
CDK6	0,017	PMAIP1	0,045
CDKN2D	0,004	PNRC2	0,043
CEACAM6	0,028	PPAPDC1B	0,000
CEACAM8	0,033	PPM1M	0,026
CEBPA	0,034	PPP1R15A	0,002
CEBPB	0,036	PRKCSH	0,039
CFD	0,011	PROX1	0,010
CFP	0,010	PTPN1	0,015
CHI3L1	0,005	PYHIN1	0,020
CHI3L2	0,007	RASGRP3	0,018
CHPT1	0,002	RCSD1	0,012
CITED2	0,036	RHOA	0,002
CLC	0,014	RHOBTB2	0,010
CLEC12A	0,002	RPL13	0,028
CLEC1A	0,005	RPL13A	0,028

---

CLEC2B	0,015	RPL18	0,001
CLEC2D	0,017	RPL27	0,009
CLEC4E	0,003	RPL28	0,011
CLEC7A	0,028	RPL29	0,024
CMKLR1	0,014	RPL3	0,015
CMTM2	0,008	RPL30	0,000
COL18A1	0,003	RPL36	0,004
COTL1	0,001	RPL36AL	0,003
CPVL	0,001	RPL38	0,002
CR1	0,029	RPL5	0,043
CREB5	0,001	RPS11	0,011
CRY1	0,019	RPS16	0,002
CSDA	0,017	RPS18	0,044
CSF1R	0,001	RPS19	0,004
CSF3R	0,004	RPS21	0,043
CSGALNACT1	0,014	RPS25	0,016
CST3	0,003	RPS3	0,004
CST7	0,021	RPS4X	0,000
CSTA	0,014	RPS5	0,039
CSTB	0,022	RPS6	0,000
CTSD	0,019	RPS9	0,010
CTSG	0,043	S100A9	0,002
CTSW	0,032	SESN1	0,036
CX3CR1	0,000	SLAMF6	0,041
CXCL2	0,001	SMAP2	0,028
CXCR1	0,035	SNRNP70	0,001
CXCR2	0,001	SNRPA	0,036
CYBA	0,016	STK32B	0,001
CYBB	0,001	TCL1A	0,003
CYP1B1	0,013	TMSB10	0,000
CYP27A1	0,028	TNFRSF13B	0,028
CYP4F2	0,046	TPT1	0,004
CYP4F3	0,009	TRPM4	0,000
D4S234E	0,037	TSTD1	0,041
DAZAP2	0,003	TXNDC5	0,028
DBI	0,003	UBB	0,003
DDIT3	0,002	UCP2	0,017
DDIT4	0,004	VAMP2	0,008
DEF8	0,011	VOPP1	0,004
DEFA3	0,010	XIST	0,000
DEFA4	0,007	ZBTB32	0,011
DENND2D	0,034	ZNF595	0,002
DGKA	0,003		
DHRS9	0,003		
DNAJA4	0,044		
DNAJB1	0,013		
DOCK4	0,024		
DOCK5	0,049		
DTX1	0,004		
DUSP1	0,006		
DUSP2	0,022		
DUSP6	0,007		
DYNLL1	0,049		
DYSF	0,044		

---

EEF1A1	0,001
EFHD2	0,047
EGR1	0,001
EIF1	0,008
EIF3H	0,035
EIF4G2	0,009
EMP1	0,010
EMR2	0,027
EMR3	0,021
ETV7	0,007
EZR	0,004
F2RL1	0,009
FAM129A	0,033
FAM134B	0,048
FAM198B	0,009
FAM49A	0,035
FAM60A	0,036
FAM65B	0,019
FCER1G	0,045
FCGR1B	0,003
FCGR2A	0,007
FCGR3A	0,000
FCN1	0,002
FFAR2	0,009
FGFBP2	0,024
FGL2	0,014
FGR	0,004
FLJ13197	0,036
FOS	0,000
FOSB	0,017
FPR1	0,026
FTH1	0,001
FYB	0,012
G0S2	0,029
GADD45B	0,000
GADD45G	0,037
GAPDH	0,001
GATA3	0,024
GBP1	0,002
GBP2	0,005
GBP5	0,002
GIMAP4	0,005
GIMAP5	0,002
GIMAP6	0,017
GIMAP7	0,013
GIT2	0,028
GLIPR1	0,010
GLIPR2	0,047
GLUL	0,005
GMFG	0,005
GNAQ	0,046
GNB4	0,008
GNLY	0,003
GOLGA8A	0,030

---

GPAT2	0,015
GPR162	0,039
GPR183	0,033
GRN	0,018
GSDMB	0,028
GTSF1	0,021
GZMA	0,006
GZMB	0,024
GZMH	0,004
GZMK	0,004
H3F3A	0,029
H3F3B	0,000
HBA2	0,036
HBB	0,010
HCK	0,043
HEY1	0,002
HIF1A	0,010
HINT1	0,030
HIP1R	0,002
HIST1H1C	0,011
HIST1H1D	0,047
HIST1H2BG	0,047
HIST2H2AA4	0,016
HIST2H2BE	0,046
HK2	0,031
HLA-B	0,001
HLA-C	0,008
HLA-DPA1	0,004
HLA-DRA	0,001
HLA-DRB1	0,025
HNRNPA1	0,015
HOMER3	0,038
HSP90AA1	0,033
HSP90B1	0,030
HSPA1A	0,000
HSPA5	0,007
HSPA6	0,028
ICOS	0,009
ID2	0,011
IER2	0,000
IER5	0,004
IFI30	0,004
IFI44	0,006
IFI44L	0,034
IFIT1	0,003
IFIT2	0,003
IFIT3	0,002
IFITM1	0,012
IFITM2	0,005
IFITM3	0,034
IL13RA1	0,030
IL15	0,005
IL32	0,010
IL5RA	0,039

---

IL7R	0,033
IL8	0,001
INPP4B	0,044
IPCEF1	0,034
IRF8	0,001
ISCU	0,021
ISG15	0,024
ITGA4	0,008
ITGA5	0,047
ITGAL	0,006
ITGB2	0,021
ITGB5	0,002
ITK	0,024
ITM2B	0,033
JUNB	0,001
JUND	0,000
KCNE3	0,002
KCNJ15	0,014
KCNQ1	0,011
KCTD12	0,008
KDM5A	0,026
KIAA0125	0,004
KIAA1257	0,027
KLF10	0,049
KLF2	0,000
KLF3	0,045
KLF4	0,014
KLF6	0,004
KLRB1	0,005
KLRK1	0,022
KRT23	0,010
L1TD1	0,015
LAG3	0,002
LAIR2	0,000
LAMP3	0,039
LCP1	0,002
LCP2	0,014
LDHA	0,050
LDHB	0,001
LGALS1	0,002
LGALS2	0,003
LILRA5	0,040
LMNA	0,025
LMO2	0,045
LPAR6	0,018
LPCAT2	0,007
LRMP	0,030
LRRC4	0,014
LST1	0,016
LTB	0,003
MAFB	0,012
MAL	0,039
MARCKS	0,034
MARCO	0,050

---

MBOAT2	0,034
MCL1	0,002
MGAM	0,022
MGAT4A	0,039
MME	0,024
MNDA	0,018
MS4A3	0,043
MS4A4A	0,035
MS4A6A	0,006
MSI2	0,001
MT2A	0,047
MXD1	0,025
MYCL1	0,025
MYL6	0,001
MYLIP	0,035
MYLK	0,015
MYO1F	0,024
MYOM2	0,022
NACA	0,001
NAMPT	0,035
NELL2	0,034
NETO1	0,008
NFKBIA	0,006
NKG7	0,007
NOSIP	0,001
NR6A1	0,037
NT5E	0,002
OASL	0,008
OAZ1	0,036
OLFM4	0,012
OS9	0,049
OSBPL5	0,001
PCBP3	0,006
PDE1B	0,047
PEBP1	0,003
PER1	0,043
PFDN5	0,001
PFN1	0,005
PI3	0,025
PIM1	0,015
PIM3	0,046
PLAC8	0,008
PLEKHA2	0,001
PLIN5	0,005
PNMA2	0,001
PNMAL1	0,041
PPP1R9A	0,006
PROK2	0,027
PRR13	0,021
PTGER4	0,032
PTGS2	0,038
PTMA	0,022
PTPN6	0,001
PXN	0,032

---

RGS2	0,002
RHOB	0,001
RILPL2	0,021
RNF130	0,046
RNU12	0,017
RPL11	0,002
RPL35A	0,004
RPL37A	0,002
RPL39	0,005
RPL41	0,001
RPL6	0,011
RPL8	0,043
RPLP0	0,010
RPLP1	0,002
RPLP2	0,000
RPS12	0,006
RPS14	0,033
RPS2	0,035
RPS20	0,013
RPS24	0,006
RPS26	0,013
RPS29	0,035
RPS4Y1	0,010
RPS8	0,037
RSAD2	0,011
RSRC2	0,046
RUNX3	0,019
S100A10	0,026
S100A11	0,009
S100A4	0,000
S100A6	0,000
S100A8	0,005
S1PR3	0,016
SAMD12	0,006
SAT1	0,000
SELL	0,001
SERINC5	0,036
SERPINA1	0,037
SF1	0,030
SFTPFB	0,035
SGK1	0,047
SH2D1A	0,043
SIDT2	0,035
SIK1	0,023
SLC25A3	0,018
SLC2A3	0,038
SMAD3	0,045
SNHG5	0,041
SNHG8	0,016
SNORD22	0,002
SNX2	0,048
SPI1	0,024
SSH2	0,027
STAT6	0,034

---

STRAP	0,047
TALDO1	0,047
TANC2	0,035
TBC1D9	0,006
THBD	0,047
TLR8	0,046
TMEM51	0,014
TMSB4X	0,000
TNF	0,024
TNFAIP2	0,015
TNFRSF12A	0,025
TNFRSF1B	0,032
TPI1	0,046
TRAT1	0,037
TRIM22	0,028
TSC22D3	0,000
TSPAN13	0,007
TUBB6	0,040
TXNIP	0,000
TYROBP	0,005
UBC	0,000
UCHL1	0,006
UTS2	0,034
VASH1	0,010
VASP	0,028
VCAN	0,024
VIM	0,008
VNN3	0,041
WSB2	0,035
ZAP70	0,001
ZFAND6	0,042
ZFP36	0,001
ZFP36L1	0,003
ZFP36L2	0,002
ZNF266	0,001
ZNF300	0,006
ZNF683	0,046
ZNF711	0,035

---

Tabela suplementar 3. Características clínicas da coorte

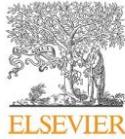
Pt.	Idade/sexo	<i>NOTCH1</i> (% r.a.)	<i>SF3B1</i>	IGVH	CITOGENÉTICA
Pt #001	65/M	M (0,49%)	WT	UM	NORMAL
Pt #002	73/M	WT	M (p.G742D)	UM	DEL14
Pt #003	70/M	M (43,8%)	WT	UM	TRIS12/ DEL11
Pt #004	67/F	M (0,11%)	M (p.K700E)	UM	NORMAL
Pt #006	48/M	M (2%)	WT	M	DEL13/DEL14
Pt #007	70/M	M (86%)	WT	UM	-
Pt #008	74/M	M (2,19%)	WT	UM	TRIS12/DEL14
Pt #009	75/M	WT	WT	UM	-
Pt #010	70/M	M (51,5%)	WT	UM	-
Pt #011	70/M	M (13,3%)	WT	UM	-
Pt #012	49/M	M (0,12%)	WT	UM	-
Pt #014	51/M	M (0,21%)	M (p.N619K)	M	DEL13
Pt #015	54/F	WT	WT	M	NORMAL
Pt #016	48/F	WT	WT	M	DEL13
Pt #017	79/M	M (41,4%)	WT	UM	DEL13/DEL14
Pt #018	67/M	M (0,18%)	WT	UM	DEL13
Pt #019	44/F	M (3,5%)	WT	M	DEL13/TRIS12
Pt#020	72/M	M (50,4%)	WT	UM	TRIS12
Pt #021	63/F	WT	WT	UM	
Pt #022	43/F	M (0,058%)	WT	M	DEL13
Pt #023	80/M	WT	WT	UM	DEL14
Pt #024	52/M	M (0,049%)	WT	UM	DEL15
Pt #025	43/F	M (0,07%)	WT	UM	DEL14
Pt #026	71/F	M (3,39%)	WT	M	-
Pt #027	87/M	M (47,6%)	WT	M	NORMAL
Pt #028	66/M	WT	WT	UM	TRIS12
Pt #030	78/M	WT	WT	M	DEL13/DEL14
Pt #031	63/M	WT	WT	UM	DEL11
Pt #032	65/M	WT	M (R775P)	M	-
Pt #033	69/F	WT	WT	UM	DEL11
Pt #034	68/F	M (45,4%)	WT	M	DEL13
Pt #035	66/F	M (45,3%)	WT	UM	TRIS12
Pt #036	56/F	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #037	61/M	M (0,041%)	WT	M	DEL13
Pt #038	63/F	WT	WT	M	DEL17
Pt #039	75/M	M (0,49%)	WT	M	DEL13
Pt #040	71/M	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #041	68/M	M (9,1%)	WT	M	DEL13
Pt #042	63/M	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #043	77/M	M (16,72%)	WT	M	DEL14
Pt #045	72/M	M (30%)	WT	UM	DEL13/TRIS12/DEL14

Pt #046	58/M	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #047	72/M	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #048	47/M	WT	WT	UM	NORMAL
Pt #049	72/F	M (33,3%)	WT	M	DEL13

---

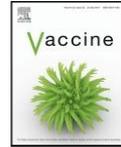
### 5.3 ARTIGOS PUBLICADOS:

Artigos publicados no período 2016-2021 tendo o doutorando Estevão Carlos Silva Barcelos como um dos autores. Segue a partir da próxima página os artigos na íntegra.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vaccine](http://www.elsevier.com/locate/vaccine)

## Intranasal vaccination with adjuvant-free *S. aureus* antigens effectively protects mice against experimental sepsis

Nataly Pescinalli Stegmiller<sup>a</sup>, Estevão Carlos Barcelos<sup>a</sup>, Janine Miranda Leal<sup>b</sup>,  
Luciana Polaco Covre<sup>b</sup>, Dirlei Molinari Donatele<sup>c</sup>, Herbert Leonel de Matos Guedes<sup>d</sup>,  
Marco Cesar Cunegundes<sup>a</sup>, Rodrigo Ribeiro Rodrigues<sup>b</sup>,  
Daniel Cláudio Oliveira Gomes<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 November 2015

Received in revised form 15 March 2016

Accepted 7 April 2016

Available online xxx

#### Keywords:

*Staphylococcus aureus*

Intranasal vaccination

Sepsis

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a Gram-positive coccal bacterium comprising part of the human skin, nares and gastrointestinal tract normal microbiota. It is also an important cause of nosocomial/community-acquired infections in humans and animals, which can cause a diverse array of infections, including sepsis, which is a progressive systemic inflammation response syndrome that is frequently fatal. The emergence of drug-resistant strains and the high toxicity of the treatments used for these infections point out the need to develop an effective, inexpensive and safe vaccine that can be used prophylactically. In this work, we used an experimental sepsis model to evaluate the effectiveness of whole antigens from *S. aureus* (SaAg) given by the intranasal route to induce protective immunity against *S. aureus* infection in mice. BALB/c mice were vaccinated via intranasal or intramuscular route with two doses of SaAg, followed by biocompatibility and immunogenicity evaluations. Vaccinated animals did not show any adverse effects associated with the vaccine, as determined by transaminase and creatinine measurements. Intranasal, but not intramuscular vaccination with SaAg led to a significant reduction in IL-10 production and was associated with increased level of IFN- $\gamma$  and NO. SaAg intranasal vaccination was able to prime cellular and humoral immune responses and inducing a higher proliferation index and increased production of specific IgG1/IgG2, which contributed to decrease the bacterial load in both liver and the spleen and improve survival during sepsis. These findings present the first evidence of the effectiveness of whole Ag intranasal-based vaccine administration, which expands the vaccination possibilities against *S. aureus* infection.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a gram-positive coccal bacterium that comprises part of the human skin, nares and gastrointestinal tract normal microbiota, but also an important opportunistic bacterial pathogen responsible for serious disease in both community and healthcare settings. In addition, this bacteria correlates with a variety of superficial and invasive infectious

diseases in human and experimental models, including pneumonia [1,2], endocarditis [3], osteomyelitis [4,5], arthritis [6], meningitis [7] and sepsis [8].

Even with recent advances in new antibiotics, *S. aureus* infections are often persistent and are also associated with treatment difficulties such as a slow therapeutic response and disease recurrence, which can lead to enhancement toxicity and emergence of multidrug-resistant strains [9]. Together, these factors indicate that there is a need to develop effective prophylactic methods, such as vaccines.

Several vaccine candidates have been developed in order to reduce the clinical and economic consequences of the diseases caused by *S. aureus*. However, most of formulations have focused on humoral immune response and neutralizing/opsonizing antibodies development, which were unable to provide protection in clinical

\* Corresponding author at: Laboratório de Imunobiologia, Núcleo de Doenças Infecciosas/Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES CEP 29043-900, Brazil. Tel.: +55 27 33357210; fax: +55 27 33357207.

E-mail address: [dgomes@ndi.ufes.br](mailto:dgomes@ndi.ufes.br) (D.C.O. Gomes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.018>

0264-410X/© 2016 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article in press as: Stegmiller NP, et al. Intranasal vaccination with adjuvant-free *S. aureus* antigens effectively protects mice against experimental sepsis. Vaccine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.018>

47 trials and exhibited inability to prime a robust innate immune-  
48 mediated microbicidal activity [10,11]. Considerable evidence has  
49 been shown the importance of the cellular immune response with  
50 T-helper type 1 (Th1) cell and cytokines expansion [12]. In addition,  
51 vaccine candidates that trigger both cellular and humoral immune  
52 response has been shown to be more effective in inducing protec-  
53 tion against *S. aureus* murine infection [11,13].

54 Mucosal vaccination is emerging as a potential method of  
55 eliciting both antigen-specific mucosal and systemic immunity  
56 and also used to induce a concomitant humoral and cellular  
57 immune responses. Moreover, the delivery of vaccines through  
58 the mucosa is both practical and non-invasive and has been found  
59 to be efficacious not only for inducing tolerance to Th2 response-  
60 associated allergens and other disease-promoting antigens but  
61 also for eliciting active systemic immunity against pathogens  
62 [14–16]. Furthermore, advantages such as low cost, low dosages,  
63 patient acceptability and the fact that specialized professionals  
64 are not needed for vaccination care after mucosal vaccination  
65 make mucosal vaccination (especially by the intranasal and oral  
66 routes) a good tool for increasing vaccine coverage in developing  
67 countries, thereby improving global health compared with the  
68 usual parenteral vaccines.

69 For many years, our group has successfully used the intranasal or  
70 oral routes to administer *Leishmania amazonensis* antigens or DNA  
71 vaccines to provide a protective immune response against cuta-  
72 neous and visceral leishmaniasis [17–21]. In this study, we used  
73 a well-described experimental mouse model of sepsis caused by *S.*  
74 *aureus* [24] to evaluate the protective effects of whole antigens from  
75 *Staphylococcus aureus* (SaAg) given by intranasal administration.

## 76 2. Materials and methods

### 77 2.1. Animals

78 BALB/c mice were originally purchased from the Jackson  
79 Laboratory (Bar Harbour, Maine). They were bred and maintained  
80 at our own facilities using sterilized bedding, filtered water and  
81 pelleted food. Female animals, 4–6 weeks of age, were used for  
82 experiments and the number of animals per group is indicated  
83 in the legend of each figure. The experimental protocols were  
84 approved by the Ethics Committee for Experimental Animal Use  
85 established by the Universidade Federal do Espírito Santo under  
86 reference number 051/2012.

### 87 2.2. Vaccination and sepsis experiment

88 Mice were vaccinated by the intranasal (i.n.) or intramuscular  
89 (i.m.) route twice at two-week intervals with 50 µg of whole  
90 *Staphylococcus aureus* antigen (SaAg; ATCC 25923 strain) obtained  
91 by 10 rounds of freezing and thawing in a total volume of 20 µl of  
92 PBS. To investigate protection against sepsis, the vaccinated mice  
93 were infected one week after the booster by an intraperitoneal  
94 inoculation of 100 µl of phosphate-buffered saline (PBS) containing  
95  $\sim 10^8$  *S. aureus*. Two days after infection, the spleen and liver were  
96 collected under sterile conditions, weighed and homogenized in  
97 tryptone soya broth medium (TSB). Aliquots from serial dilutions of  
98 these samples were plated on agar Muller-Hinton plates and incu-  
99 bated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Colony forming unit (CFU)  
100 counts were performed 18 h later. The results were expressed as  
101 the CFU median log per organ.

### 102 2.3. Evaluation of acute systemic toxicity

103 Mice were vaccinated (as described previously) or received 1%  
104 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (Sigma–Aldrich) in peanut oil via the  
105 intraperitoneal route. Twenty-four hours post-administration, the

106 animals were euthanized to determine the aspartate aminotrans-  
107 ferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatinine levels  
108 in serum, which were assessed using colorimetric diagnostic kits  
109 according to the manufacturer's instructions (Doles – Brazil).

### 110 2.4. Cytokine production and cell proliferation analysis

111 Splenocytes suspension were prepared and incubated at 37 °C  
112 in 24-well flat-bottom plates at  $5 \times 10^6$  cells/ml in DMEM supple-  
113 mented with 10% of HIFCS and 50 µM 2-mercaptoetanol in the  
114 presence or absence of *S. aureus* antigen (25 µg/ml) for 72 h. ConA  
115 (10 µg/ml)-stimulated cells were used as a positive control. The  
116 levels of IL-10, IL-4 and IFN-γ in the cell culture supernatants were  
117 detected by ELISA assays following the manufacturer's instructions  
118 (R&D Systems, Minneapolis, USA).

119 Proliferation analyses were performed using splenocytes  
120 labelled with 5 µM of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)  
121 that were cultured in 96-well plates at  $5 \times 10^6$  cells/ml with SaAg  
122 (50 µg/ml) or ConA (10 µg/ml) for 72 h. A FACS analysis was per-  
123 formed to assess proliferation by CFSE dye dilution. Unlabelled cells  
124 and unstimulated CFSE-labelled cells were used as controls.

### 125 2.5. Nitric oxide production

126 On day 15 of infection, splenocytes were re-stimulated in  
127 vitro with SaAg (25 µg/ml) for 72 h, and nitric oxide (NO) pro-  
128 duction was measured in the supernatants using the Griess  
129 method [25] Briefly, 50 µl of cell culture supernatants was mixed  
130 with 50 µl of Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% N-1-  
131 naphthylethylenediamine dihydrochloride in 2.5% o-phosphoric  
132 acid) and incubated at room temperature for 10 min. The nitrite  
133 concentrations were determined at 540 nm using a standard  
134 sodium nitrite curve.

### 135 2.6. *S. aureus*-specific antibodies

136 *S. aureus*-specific IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> levels were measured in the  
137 sera of each mouse by direct ELISA using SaAg-coated microplates.  
138 Briefly, 96-well ELISA plates were coated with soluble antigen of *S.*  
139 *aureus* (50 µg/ml) for 18 h at 4 °C. Blocking was performed using 5%  
140 HIFCS in PBS following three washes. The mouse sera were added  
141 at a ratio of 1:400 for 2 h at room temperature. Biotinylated anti-  
142 mouse IgG1 or IgG2a was added for 1 h at 37 °C. The plates were  
143 further incubated with streptavidin-conjugated peroxidase for 1 h  
144 at room temperature followed by the addition of 100 µl of TMB sub-  
145 strate. The antibody concentrations were determined at 450 nm.

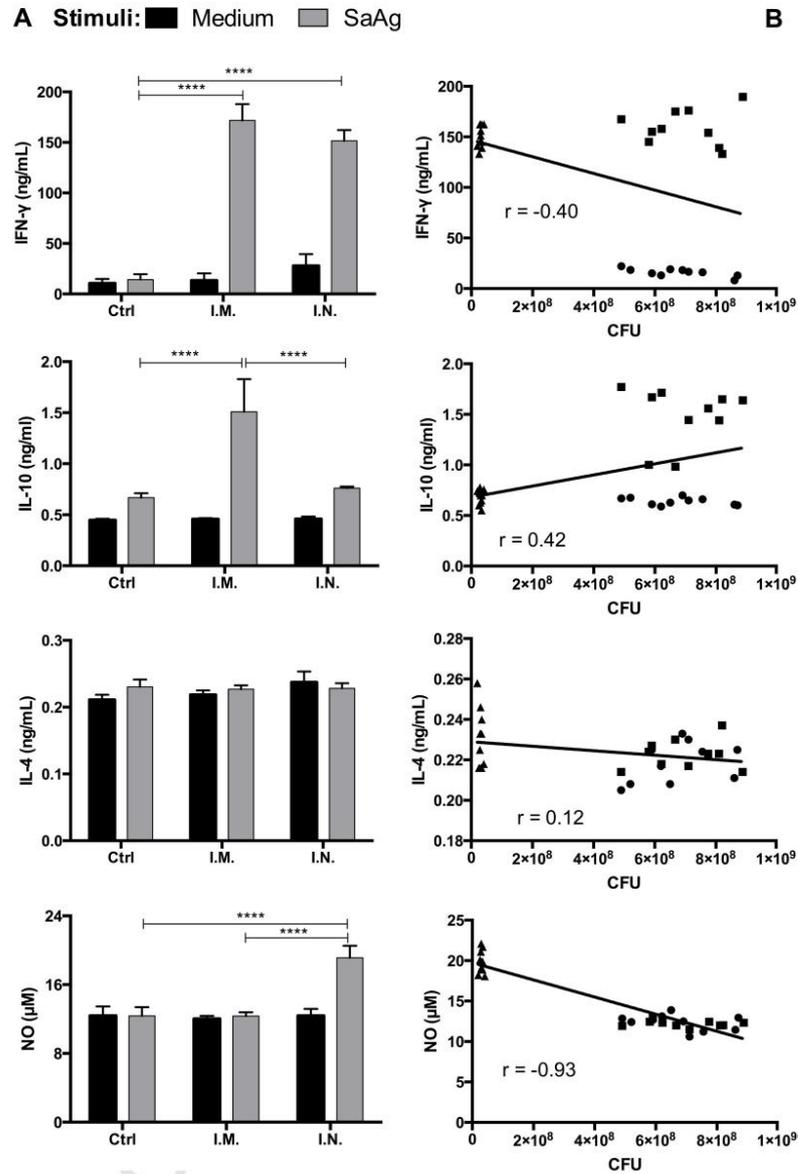
### 146 2.7. Statistics

147 The data were statistically analyzed using the GraphPad Prism  
148 software program version 6.0 for Mac. The means of normally dis-  
149 tributed variables were compared by an ANOVA simple factorial  
150 test and by a one-way ANOVA, followed by Tukey's honestly sig-  
151 nificant difference (Tukey's HSD) post hoc test and by Spearman's  
152 rank-correlation method. The data were considered to be signifi-  
153 cantly different when  $p < 0.05$ .

## 154 3. Results

### 155 3.1. SaAg led to an increased antigen-specific immune response 156 in immunized mice

157 To evaluate specific cell-mediated immune responses after  
158 immunization, we performed an experiment to assess the spleen  
159 lymphocyte proliferation and cytokine production in response  
160 to *S. aureus* antigen recall. Splenocytes from the intranasally  
161 (i.n.)- and intramuscularly (i.m.)-vaccinated mice produced

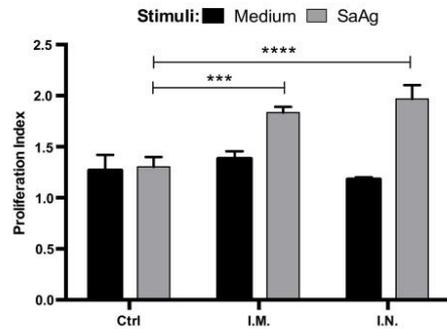


**Fig. 1.** Effects of vaccination on the production of specific cytokines and nitric oxide. Mice were vaccinated by the intranasal (i.n.) or intramuscular (i.m.) route twice at one-week intervals with 50  $\mu$ g of whole *Staphylococcus aureus* antigens (SaAg). The control group did not receive any intervention. One week after the booster dose, splenocytes were cultured at  $5 \times 10^6$  cells/ml in the presence or absence of 25  $\mu$ g/ml of SaAg for 72 h. (A) The levels of IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 and NO were determined in the culture supernatants by ELISA. (B) The correlation between cytokine or NO production and CFU in the liver. Each point represents one animal. Control - Ctrl (●), SaAg given by the intramuscular - i.m. (■) or intranasal - i.n. route (▲). The horizontal bars represent the median values. The results are represented as arithmetic means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

162 significantly higher amounts of IFN- $\gamma$  compared with the control  
163 group (Fig. 1A). The splenocytes from the mice vaccinated by intra-  
164 muscular injection produced significantly more IL-10 than those  
165 from the mice of control and intranasal groups, which showed

similar cytokine production (Fig. 1A). No significant difference in  
IL-4 production was detected among the evaluated groups (Fig. 1A).  
To assess a possible molecular mechanism involved in killing bacteria,  
we investigated nitric oxide (NO) production in the splenocyte

166  
167  
168  
169



**Fig. 2.** Effects of vaccination on the specific lymphocyte proliferation. Mice were vaccinated as described above ( $n=10$ /group). One week after the booster dose, splenocytes were labelled with CFSE and cultured at  $5 \times 10^6$  cells/ml in the presence or absence of 25  $\mu$ g/ml of SaAg for 72 h. The proliferation index was calculated based on the ratio of the total number of divisions/number of divided cells using the Prism software program. The results were expressed as the arithmetic means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

170 supernatants after Ag stimulation. As shown in Fig. 1A, the i.n.-  
171 vaccinated mice produced significantly more NO compared with  
172 the i.m.-vaccinated group and the control group. As a complement  
173 to these findings, a negative correlation was observed between  
174 IFN- $\gamma$  or NO production and CFU in the liver (Fig. 1B) and spleen  
175 (data not shown), indicating that IFN- $\gamma$  and NO levels are related  
176 to the extent of infection. Conversely, a positive correlation was  
177 observed between IL-10 production and liver CFU, indicating that  
178 its production was also associated with disease severity (Fig. 1B).

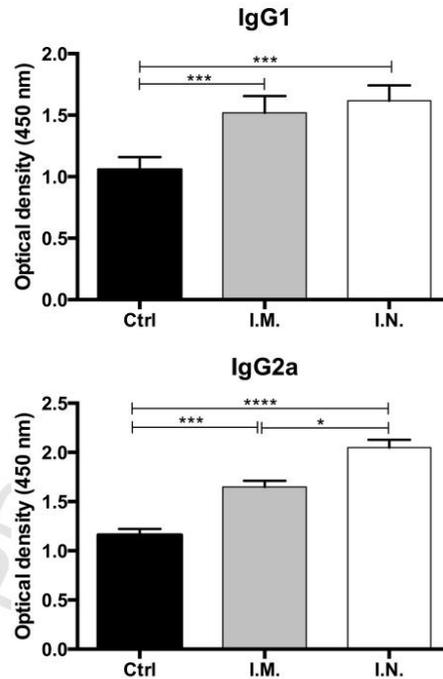
179 Due to increased production of cytokines and inflammatory  
180 mediators observed after SaAg vaccination, we evaluated the  
181 lymphoproliferative capacity of spleen cells in response to *S.*  
182 *aureus* antigen recall. The splenocytes from both the i.n. and  
183 i.m.-vaccinated mice exhibited significantly higher proliferation  
184 compared with the control group. However, no significant differ-  
185 ence was observed between these two treatment groups (Fig. 2).

### 186 3.2. SaAg administration differentially modulates specific 187 antibody production

188 IgG1 and IgG2a isotype levels are, respectively, associated with  
189 the Th2 and Th1 responses. Thus, to correlate the immune response  
190 with the development of humoral immunity, we evaluated the pro-  
191 duction of anti-*S. aureus* IgG1 and IgG2a antibody isotypes in the  
192 sera from all groups. The IgG1 and IgG2a isotype levels in both the  
193 intramuscular and the intranasal vaccination groups were signif-  
194 icantly higher than those obtained in the control mice (Fig. 3). In  
195 addition, the i.n.-vaccinated mice exhibited a significant difference  
196 in IgG2a levels compared with the mice vaccinated via intramus-  
197 cular injection (Fig. 3).

### 198 3.3. Vaccination with *S. aureus* antigens (SaAg) does not induce 199 acute systemic toxicity

200 To investigate whether SaAg vaccination could induce acute  
201 systemic toxicity, we evaluated the biochemical parameters of  
202 cardiac (AST), hepatic (ALT) and kidney (creatinine) damage 24 h  
203 after the booster dose was administered in the immunized mouse  
204 serum. No differences in AST, ALT or creatinine levels were observed  
205 after intranasal or intramuscular SaAg vaccination compared with  
206 the negative control group that was administered PBS (Fig. 4).  
207 In contrast, the positive control group that was injected with  
208 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) exhibited significant increases in all



**Fig. 3.** Effects of vaccination on antibody production. Mice were vaccinated as described above ( $n=10$ /group). One week after the booster dose, the animals were bled, and total IgG1 and IgG2 levels were measured in the serum by an ELISA assay. The horizontal bars represent the median values. The results are represented as the arithmetic means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

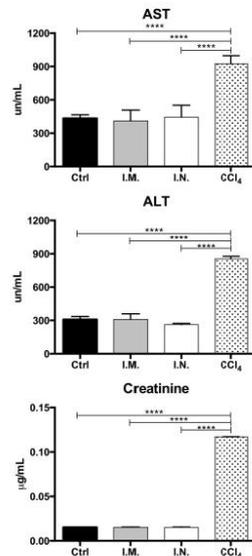
209 three biochemical parameters compared with the negative control,  
210 intramuscular and intranasal groups (Fig. 4). In addition, the  
211 i.n.-vaccinated animals showed no changes at the administration  
212 site after SaAg administration. This was in contrast to the  
213 i.m.-vaccinated group, which presented with inflammatory signs  
214 (redness, swelling) and lameness (data not shown).

### 215 3.4. Intranasal vaccination enhances the protective immune 216 response against *S. aureus* challenge

217 To evaluate the effects of SaAg vaccination on the protective  
218 immune response, the control and vaccinated groups were chal-  
219 lenged one week after the booster dose with a lethal dose of *S.*  
220 *aureus*. The i.n.-vaccinated mice exhibited a significantly lower bac-  
221 terial load in both the liver and spleen compared with the control  
222 and i.m.-vaccinated groups (Fig. 5A). Moreover, the intramuscu-  
223 lar immunization group failed to control infection in either organ,  
224 with the mice exhibiting bacterial loads comparable to those of the  
225 control group (Fig. 5A). As a complement to these findings, 60% of  
226 the control mice and mice that received intramuscular immuniza-  
227 tions succumbed to infection 72 h after challenge, in contrast to the  
228 i.n.-vaccinated mice, which showed 95% survival (Fig. 5B).

## 229 4. Discussion

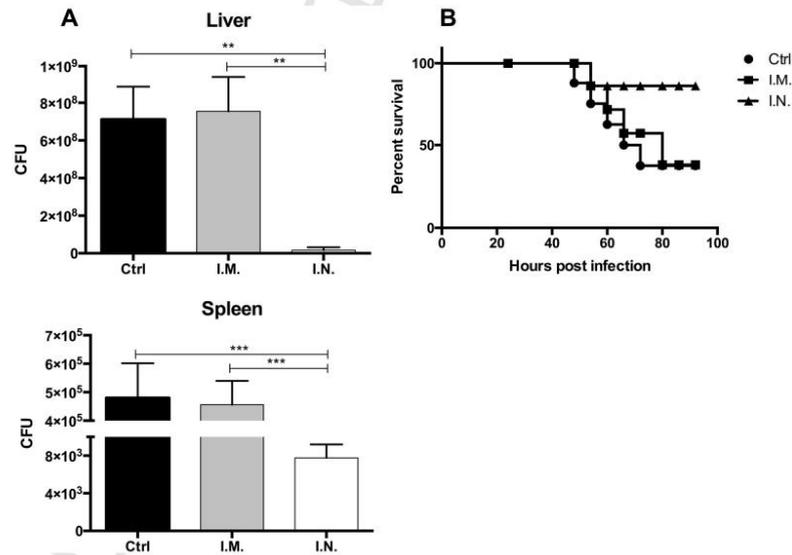
230 Mucosal vaccines have emerged as a new tool to induce protec-  
231 tive immune responses against different pathogens [26]. Mucosal



**Fig. 4.** The results of the toxicological analysis of the SaAg vaccine. Mice were vaccinated as described above ( $n = 8-10$ /group). Twenty-four hours post-booster, AST (A), ALT (B) and creatinine (C) levels were evaluated in the serum by a colorimetric assay. The results are represented as the arithmetic means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \*\*\*\* $p < 0.0001$  compared with the control or vaccinated groups.

vaccines are especially useful because the mucosal membranes of the various tissues are linked together as part of a common mucosal immune network that allows immune cells to recirculate and migrate to distant lymphoid organs, such as the lymph nodes, spleen, and Peyer's patches, providing not only mucosal immunity but also systemic protection against infection [27]. Furthermore, the mucosa is an alternative route for the administration of weakly immunogenic or disease-inducing antigens, for which the parenteral route appears to be deleterious or inefficacious for the induction of an immune response [28]. We have successfully used the intranasal route to administer *Leishmania* antigens that led to a protective immune response against cutaneous and visceral leishmaniasis [17,18,26,27], which was accompanied by the expansion of the Th1 cell type immune response. Here, we extended these findings and showed for the first time that intranasal immunization with an adjuvant-free vaccine could generate increased immunogenicity and protect mice against sepsis caused by *S. aureus*. In addition, we also demonstrated the SaAg vaccination safety/biocompatibility advantages to be used as a vaccine formulation. Our data emphasize that both intranasal and intramuscular SaAg delivery were safe and well tolerated as demonstrated by measurements of ALT, AST and creatinine levels. Elevation of enzymes such as ALT and AST is observed during classical liver, kidney and/or muscle cells injury caused by drug administration or disease and have been used as good markers for drug and vaccine safety [30].

The host immune response during sepsis is not a simple excessive inflammatory reaction. An immunosuppressive profile has been observed in patients and mice during sepsis with negative regulation of the immune response and significant increases in the levels of IL-10, IL-4, and IL-13, compromising the T-cell function [31]. Intranasal vaccination was able to efficiently inhibit suppres-



**Fig. 5.** The effects of vaccination on bacterial burden. Mice were vaccinated as described above ( $n = 10$ /group). One week after the booster dose, the vaccinated mice were injected with  $10^8$  colony forming units (CFU) of *S. aureus*, followed by the determination of bacteria counts in the liver, spleen and lavage fluid two days after challenge (A). The results are presented as the arithmetic means  $\pm$  S.D. from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . The survival of immunized mice after challenge with *S. aureus*. Mice were immunized by the intramuscular or intranasal route ( $n = 9$ /group) and were challenged with *S. aureus* as described previously. Survival was monitored for 92 h (B). Significance was calculated according to Cox's F-test (\* $p < 0.05$  compared with the intranasal group; n.s., not significant).

Please cite this article in press as: Stegmiller NP, et al. Intranasal vaccination with adjuvant-free *S. aureus* antigens effectively protects mice against experimental sepsis. Vaccine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.018>

sive IL-10 production but also stimulated the pro-inflammatory mediators of the Th1 response, such as IFN- $\gamma$ , which could contribute to the activation of bactericidal mechanisms. Although intramuscular vaccination also induced IFN- $\gamma$  production, it was not sufficient to activate microbicidal nitric oxide production, most likely due to the increased IL-10 production and immune suppression that were observed following the administration of ineffective antigens or during sepsis. In addition, this data suggests that the nitric oxide production was stimulated by an IFN- $\gamma$  independent pathway [32].

Interestingly, the cells from the SaAg intranasally-vaccinated mice, but not the intramuscularly-vaccinated mice, exhibited higher lymphoblastic activity in response to *S. aureus* antigen stimulation. In addition to the humoral immune response and the production of neutralizing antibodies, T cells play an important protective role against *S. aureus* infection [10,11] even in the complete absence of an antibody response [33], supporting the notion that bacterial vaccination strategies should target T cell responses. In addition, the failure of many candidate vaccines has been shown to correlate with a defective induction of the cellular immune response [10,11].

Our results showed that there were no significant differences in IgG1 levels between the intramuscular and the intranasal groups. However, the SaAg intranasally-vaccinated mice exhibited increased levels of IgG2a. This suggests that the route of administration not only affects antibody production but also affects cellular immune differentiation because IgG2a and IgG1 production have been associated with the production of IL-12/IFN- $\gamma$  and IL-4/IL-10, respectively, which supports our findings with respect to cytokine production and T cell proliferation.

Currently, vaccine efficacy against *S. aureus* is defined as an increase in the spontaneous cure rate and survivalability against infection after antigen administration [34]. In our study, measurements of the bacterial load in the lethal-dose experiments demonstrated that intranasal vaccination increased the percent survival at a high dose of *S. aureus* compared with intramuscular vaccination. Memory cells are constantly being generated in the mucosa of naive mice in response to cross-reactive antigens from pathogens [35], so it is feasible to consider that these memory cells are involved in the more effective immunity generated when SaAg are administered into the nasal mucosa rather than into the peripheral muscle, which could explain the acquired protection after intranasal vaccination. Furthermore, unsuccessful animal experiments or human clinical trials may indicate that the route of administration is important with regard to the generation of protective immunity against *S. aureus* infection [36].

Taken together, the results of our study highlight the high efficacy of the new vaccine strategy against *S. aureus*. The results described herein support a model whereby delivery using a well-established intranasal formulation could be used as a new tool to induce a potent and effective immune response against sepsis or potentially other diseases caused by *S. aureus* infection.

#### Authors' contribution

Designed the experiments: DCOG and RRR. Performed the experiments: NPS, JLM, EB, and LPC. Provided reagents: HLMG and DMD. Manuscript preparation: DCOG, RRR, MCC. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

#### Uncited references

[22,23,29].

Please cite this article in press as: Stegmiller NP, et al. Intranasal vaccination with adjuvant-free *S. aureus* antigens effectively protects mice against experimental sepsis. Vaccine (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.018>

#### Acknowledgements

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo, Brazil (FAPES). The authors would like to thank Dr. Ana Paula Nunes Ferreira and Dr. Ricardo Pinto Schuenk for their excellent technical support.

**Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### References

- Ferrara AM. Treatment of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2007;30:19–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.02.011>.
- Risson DC, O'Connor ED, Guard RW, Schooneveldt JM, Nimmo GR. A fatal case of necrotising pneumonia due to community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Med J Aust 2007;186:479–80.
- Fernández Guerrero MI, González López JJ, Goyenechea A, Fraile J, de Górgolas M. Endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*: a reappraisal of the epidemiologic, clinical, and pathologic manifestations with analysis of factors determining outcome. Medicine (Baltimore) 2009;88:1–22, <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e318194da65>.
- Ellington JK, Harris M, Webb L, Smith B, Smith T, Tan K, et al. Intracellular *Staphylococcus aureus*. A mechanism for the indolence of osteomyelitis. J Bone Joint Surg Br 2003;85:918–21, <http://dx.doi.org/10.1302/0301-620X.85B6.13509>.
- Metsemakers W-J, Emanuel N, Cohen O, Reichart M, Potapova I, Schmid T, et al. A doxycycline-loaded polymer-lipid encapsulation matrix coating for the prevention of implant-related osteomyelitis due to doxycycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Control Release 2015;209:47–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.04.022>.
- Ghosh C, Bishayi B. Toll-like receptor 2 and 6 interdependency in the erosive stage of *Staphylococcus aureus* induced septic arthritis mediated by IFN- $\gamma$  and IL-6 – a possible involvement of IL-17 in the progression of the disease. Immunobiology 2015;1–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.01.012>.
- Thammavongsa V, Rauch S, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. Protein A-neutralizing monoclonal antibody protects neonatal mice against *Staphylococcus aureus*. Vaccine 2015;33:523–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.11.051>.
- Hoshi M, Osawa Y, Ito H, Ohtaki H, Ando T, Takamatsu M, et al. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase reduces mortality from peritonitis and sepsis in mice by regulating functions of CD11b<sup>+</sup> peritoneal cells. Infect Immun 2014;82:4487–95, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02113-14>.
- Pincus NB, Reckhow JD, Saleem D, Jammeh ML, Datta SK, Myles IA. Strain specific phage treatment for *Staphylococcus aureus* infection is influenced by host immunity and site of infection. PLOS ONE 2015;10:e0124280, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124280>.
- Bagnoli F, Bertholet S, Grandi G. Inferring reasons for the failure of *Staphylococcus aureus* vaccines in clinical trials. Front Cell Infect Microbiol 2012;2:2–5, <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00016>.
- Spellberg B, Daum R. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*. Semin Immunopathol 2012;34:335–48, <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0293-5>.
- Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, et al. Th1–Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice 2009;5, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000703>.
- Daum RS, Spellberg B. Progress toward a *Staphylococcus aureus*. Vaccine 2012;54, <http://dx.doi.org/10.1093/acid/cir828>.
- Mestecky J, Moldoveanu Z, Elson CO. Immune response versus mucosal tolerance to mucosally administered antigens. Vaccine 2005;23:1800–3, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.009>.
- Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, et al. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:17525–30, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0503428102>.
- Fouda GA, Amos JD, Wilks AB, Pollara J, Ray CA, Chand A, et al. Mucosal immunization of lactating female rhesus monkeys with a transmitted/founder HIV-1 envelope induces strong Env-specific IgA antibody responses in breast milk. J Virol 2013;87:6986–99, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00528-13>.
- Carapau D, Mitchell R, Nacer A, Shaw A, Othoro C, Frevert U, et al. Protective humoral immunity elicited by a needle-free malaria vaccine comprised of a chimeric *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein and a Toll-like receptor 5 agonist, flagellin. Infect Immun 2013;81:4350–62, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00263-13>.

- 397 [18] Wahid R, Fresnay S, Levine MM, Szein MB. Immunization with Ty21a live  
398 oral typhoid vaccine elicits crossreactive multifunctional CD<sup>8+</sup> T-cell responses  
399 against *Salmonella enterica* serovar Typhi, S. Paratyphi A, and S. Paratyphi B in  
400 humans. *Mucosal Immunol* 2015;1-11. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2015.24>.
- 401 [19] Pinto EF, De Mello Cortezia M, Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma-inducing  
402 oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and  
403 C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 2003;21:3534-41.  
404 [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00427-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00427-4).
- 405 [20] Pinto EF, Pinheiro RO, Rayol A, Larraga V, Rossi-Bergmann B. Intranasal  
406 vaccination against cutaneous leishmaniasis with a particulated leishman-  
407 ial antigen or DNA encoding LACK. *Infect Immun* 2004;72:4521-7.  
408 <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.8.4521-4527.2004>.
- 409 [21] Gomes DCDO, Pinto EF, Melo LDBD, Lima WP, Larraga V, Lopes UG, et al.  
410 Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective  
411 immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 2007;25:2168-72.  
412 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.060>.
- 413 [22] De Oliveira Gomes DC, Da Silva Costa Souza BL, De Matos Guedes HL, Lopes UG,  
414 Rossi-Bergmann B. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protec-  
415 tive immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitology*  
416 2011;138:1892-7. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011001417>.
- 417 [23] da Silva-Couto L, Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, da Silva Costa Souza BL,  
418 Moreira OC, Gomes-Silva A, et al. Intranasal vaccination with leishmanial  
419 antigens protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) against Leish-  
420 mania (Viannia) braziliensis infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e3439.  
421 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003439>.
- 422 [24] Sandberg A, Hessler JHR, Skov RL, Blom J, Frimodt-Møller N. Intracel-  
423 lular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse  
424 peritonitis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1874-83.  
425 <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01605-07>.
- 426 [25] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR.  
427 Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*  
428 1982;126:131-8. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X).
- 429 [26] Newsted D, Fallahi F, Golshani A, Azizi A. Advances and chal-  
430 lenges in mucosal adjuvant technology. *Vaccine* 2015;33:2399-405.  
431 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.096>.
- 432 [27] McDermott M, Brais LJ, Eveleigh MJ. Mucosal and systemic antiviral antibodies  
433 in mice inoculated intravaginally with herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol*  
1990;71:1497-504.
- 434 [28] Pinheiro RO, Pinto EF, de Matos Guedes HL, Filho OAA, de Mattos  
435 KA, Saraiva EM, et al. Protection against cutaneous leishmaniasis by  
436 intranasal vaccination with lipophosphoglycan. *Vaccine* 2007;25:2716-22.  
437 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.093>.
- 438 [29] Leonel H, Guedes DM, Lilian B, Chaves SP, Cláudio D, Gomes DO, et al.  
439 Intranasal vaccination with extracellular serine proteases of *Leishmania amazo-*  
440 *ensis* confers protective immunity to BALB/c mice against infection 2014:1-7.  
441 <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-448>.
- 442 [30] Kura a U, Cheah PS, Hussein MZ, Hassan Z, Tengku Azmi TI, Hussein  
443 NF, et al. Toxicity evaluation of zinc aluminium levodopa nanocompos-  
444 ite via oral route in repeated dose study. *Nanoscale Res Lett* 2014;9:261.  
445 <http://dx.doi.org/10.1186/1556-276X-9-261>.
- 446 [31] Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. *Staphylococ-*  
447 *cus aureus* colonization: modulation of host immune response  
448 and impact on human vaccine design. *Front Immunol* 2014;4:507.  
449 <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00507>.
- 450 [32] Eigenbrod T, Bode Ka, Dalpke AH. Early inhibition of IL-1 $\beta$  expression  
451 by IFN- $\gamma$  is mediated by impaired binding of NF- $\kappa$ B to the IL-1 $\beta$   
452 promoter but is independent of nitric oxide. *J Immunol* 2013;190:6533-41.  
453 <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300324>.
- 454 [33] Misstear K, Mcneela E, Murphy A, Geoghegan AG, O'keeffe JA, Fox KM,  
455 et al. Targeted nasal vaccination provides antibody-independent pro-  
456 tection against *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2014;209:1479-84.  
457 <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit636>.
- 458 [34] Middleton JR, Luby CD, Adams DS. Efficacy of vaccination against *Staphy-*  
459 *lococcal mastitis*: a review and new data. *Vet Microbiol* 2009;134:192-8.  
460 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.053>.
- 461 [35] Julia V, McSorley SS, Malherbe L, Breittmayer JP, Girard-Pipau F, Beck  
462 A, et al. Priming by microbial antigens from the intestinal flora deter-  
463 mines the ability of CD<sup>4+</sup> T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c  
464 mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol* 2000;165:5637-45.  
465 <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5637>.
- 466 [36] Huda T, Nair H, Theodoratou E, Zgaga L, Fattom A, El Arifeen S, et al. An  
467 evaluation of the emerging vaccines and immunotherapy against staphy-  
468 lococcal pneumonia in children. *BMC Public Health* 2011;11(Suppl. 3):S27.  
469 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-11-S3-S27>.



# NOTCH1 Is Aberrantly Activated in Chronic Lymphocytic Leukemia Hematopoietic Stem Cells

Mauro Di Ianni<sup>1,2†</sup>, Stefano Baldoni<sup>3†</sup>, Beatrice Del Papa<sup>4†</sup>, Patrizia Aureli<sup>4</sup>, Erica Dorillo<sup>4</sup>, Filomena De Falco<sup>4</sup>, Elisa Albi<sup>4</sup>, Emanuela Varasano<sup>4</sup>, Ambra Di Tommaso<sup>3</sup>, Raffaella Giancola<sup>2</sup>, Patrizia Accorsi<sup>2</sup>, Gianluca Rotta<sup>5</sup>, Chiara Rompietti<sup>4</sup>, Estevão Carlos Silva Barcelos<sup>4,6</sup>, Antonio Francesco Campese<sup>7</sup>, Paolo Di Bartolomeo<sup>2</sup>, Isabella Screpanti<sup>7</sup>, Emanuela Rosati<sup>8</sup>, Franca Falzetti<sup>4\*</sup> and Paolo Sportoletti<sup>4\*\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Marc Vooijs,  
Maastricht University, Netherlands

### Reviewed by:

Lucio Miele,  
LSU Health Sciences Center New Orleans, United States  
Sathish Kumar Mungamuri,  
Asian Institute of Gastroenterology, India

### \*Correspondence:

Paolo Sportoletti  
sportolp@gmail.com

<sup>†</sup>These first authors contributed equally to this article.

<sup>\*\*</sup>These senior authors contributed equally to this article.

### Specialty section:

This article was submitted to Molecular and Cellular Oncology, a section of the journal *Frontiers in Oncology*

**Received:** 26 January 2018

**Accepted:** 23 March 2018

**Published:** 20 April 2018

### Citation:

Di Ianni M, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, De Falco F, Albi E, Varasano E, Di Tommaso A, Giancola R, Accorsi P, Rotta G, Rompietti C, Silva Barcelos EC, Campese AF, Di Bartolomeo P, Screpanti I, Rosati E, Falzetti F and Sportoletti P (2018) NOTCH1 Is Aberrantly Activated in Chronic Lymphocytic Leukemia Hematopoietic Stem Cells. *Front. Oncol.* 8:105. doi: 10.3389/fonc.2018.00105

<sup>1</sup>Department of Medicine and Aging Sciences, University of Chieti Pescara, Chieti, Italy, <sup>2</sup>Department of Hematology, Transfusion Medicine and Biotechnologies, Ospedale Civile, Pescara, Italy, <sup>3</sup>Department of Life, Health and Environmental Sciences, Hematology Section, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy, <sup>4</sup>Institute of Hematology-Centro di Ricerche Emato-Oncologiche (CREO), University of Perugia, Perugia, Italy, <sup>5</sup>BD Biosciences, San Jose, Italy, <sup>6</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, <sup>7</sup>Department of Molecular Medicine, Sapienza, University of Rome, Rome, Italy, <sup>8</sup>Department of Experimental Medicine, Biosciences and Medical Embryology Section, University of Perugia, Perugia, Italy

To investigate chronic lymphocytic leukemia (CLL)-initiating cells, we assessed *NOTCH1* mutation/expression in hematopoietic stem cells (HSCs). In *NOTCH1*-mutated CLL, we detected subclonal mutations in 57% CD34+/CD38- HSCs. *NOTCH1* mutation was present in 66% CD34+/CD38+ progenitor cells displaying an increased mutational burden compared to HSCs. Flow cytometric analysis revealed significantly higher *NOTCH1* activation in CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ cells from CLL patients, regardless *NOTCH1* mutation compared to healthy donors. Activated *NOTCH1* resulted in overexpression of the *NOTCH1* target c-MYC. We conclude that activated *NOTCH1* is an early event in CLL that may contribute to aberrant HSCs in this disease.

**Keywords:** notch signaling, chronic lymphocytic leukemia, hematopoietic stem cells, *NOTCH1* mutation, CD34+ cells

## INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a mature B cell malignancy characterized by accumulation of clonal B cells in blood, bone marrow (BM), and lymphoid tissues. The search for CLL-initiating cells has never been successful. While several cell types have been suggested as giving rise to CLL, yet, there is no consensus as to its normal cellular counterpart (1). CLL cells have monoclonal immunoglobulin gene rearrangements, suggesting that lymphoid malignant stem cells originate after cells have committed to the lymphoid lineage. More recently, it has been reported that hematopoietic stem cells (HSCs) from CLL patients display the propensity to generate clonal B cells, suggesting the involvement of HSCs in lymphoid leukemogenesis (2).

In 2009, we first identified *NOTCH1* mutations in CLL (3) and provided data on the adverse prognostic outcome associated with mutated *NOTCH1* (4). More recently, independent studies confirmed the presence and the prognostic relevance of *NOTCH1* mutations in CLL patients (5). All mutations resulted in *NOTCH1* impaired degradation that led to *NOTCH1* deregulated signaling, indicating that mutations could contribute to increase *NOTCH* activation in CLL (6, 7). Recently, analyses of peripheral blood CD34+CD19- cells and BM hematopoietic progenitors revealed

*NOTCH1* mutation in some CLL samples (8, 9). Conversely, others failed to demonstrate the presence of *NOTCH1* mutations in circulating CD34+ cells from *NOTCH1* mutated patients (10). In lymph node, CLL cells show *NOTCH1* activation independent of mutation (11) and recent evidence have shown non-mutational *NOTCH1* signaling with anti-apoptotic effects in peripheral blood CLL cells (12). However, the role of *NOTCH1* signaling in the HSC compartment of CLL is still unknown.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Separation and Flow Cytometry

We collected 28 BM samples including 21 CLL patients (15 *NOTCH1* mutated and 6 *NOTCH1* wild type) and 7 healthy donors (HDs). BM and peripheral blood (PB) cells were collected under signed informed consent in accordance with Declaration of Helsinki and the Institutional Review Board of University of Perugia. Patient's characteristics are described in Table S1 in Supplementary Material. BM cells from 10 *NOTCH1* mutated CLL were single and/or double-sorted into CD34+CD38– HSCs and CD34+CD38+ progenitor fraction containing myeloid and lymphoid progenitors. Briefly, BM mononuclear cells were separated by Ficoll–Hypaque density gradient centrifugation. Flow cytometric analysis and cell-sorting were performed using the following antibodies: PE anti-CD34 and PC5 anti-CD38 (Beckman Coulter), PerCP-Cy5.5 anti-CD34, FITC anti-CD19, PE-Cy7 anti-CD38, APC-H7 anti-CD10, V450 anti-CD3, and V500 anti-CD45 (BD Biosciences). *NOTCH1* ICN on sorted populations was performed using PE anti-*NOTCH1* (mN1A) (eBioscience). Cells were analyzed using a FACSCanto II and sorted using a FACS Aria III cell sorter (BD Biosciences).

### Direct Sanger Sequencing

*NOTCH1* gene mutational analysis was performed by directional sequencing of PCR fragments from genomic DNA. Primers and PCR conditions were as previously described (13).

### Allele-Specific PCR (AS-PCR), Droplet Digital PCR (ddPCR), RT-PCR

Allele-specific PCR was performed accordingly to a previously published protocol (13). ddPCR *NOTCH1* probes assays (dHsaCP2500500 and dHsaCP2500501 Bio-Rad) were used to determinate the allelic burden of *NOTCH1* in sorted cells. The droplet generated included DNA, *Notch1* probes assays (1X), and ddPCR Supermix (2X) for Probes (no dUTP) (Bio-Rad). The mix was amplified by PCR and analyzed by QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Scatterplots depicting ddPCR results specifically for the *NOTCH1* mutation assay. Real-time PCR analysis of *c-MYC* and *Hes1* gene expression was performed in immunoselected CD34+ BM cells. RNA was extracted using RNeasy Plus Kits (Qiagen, Hilden, Germany), and cDNA was obtained using Prime Script RT Master Mix (Takara Bio, Dalian, China). Real-time qPCR was performed with PCR Master Mix Power SYBER Green (Applied Biosystem, Warrington, UK) using the 7900HT fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The primers sequence were F:5'-CTTCTCTCCGTCCTCGGATTCT-3' and R:5'-GAAGGTGATC

CAGACTCTGACCTT-3' for *c-Myc*, F:5'-AAGAAAGATAGCTCGCGGCAT-3' and R:5'-CCAGCACACTTGGGTCTGT-3' for *Hes1* and F:5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTGCG-3' and R:5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3' for *GAPDH*. Relative fold change was normalized to *GAPDH* and calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### Western Blot Analysis

Whole-cell lysates extracted from BM CD34+ cells ( $5 \times 10^5$ ) of CLL patients and HDs were analyzed by western blot using an anti-*NOTCH1* antibody (clone bTAN20) able to detect the 300-kDa inactive precursor (FL), the 120-kDa transmembrane/cytoplasmic/cytoplasmic (TM) subunit, and the active 100-kDa intracellular domain. Whole-cell lysates (3  $\mu$ g) isolated from peripheral blood CD5+CD19+ CLL cells of *NOTCH1* mutated patients were used as positive control.

### Statistical Analysis

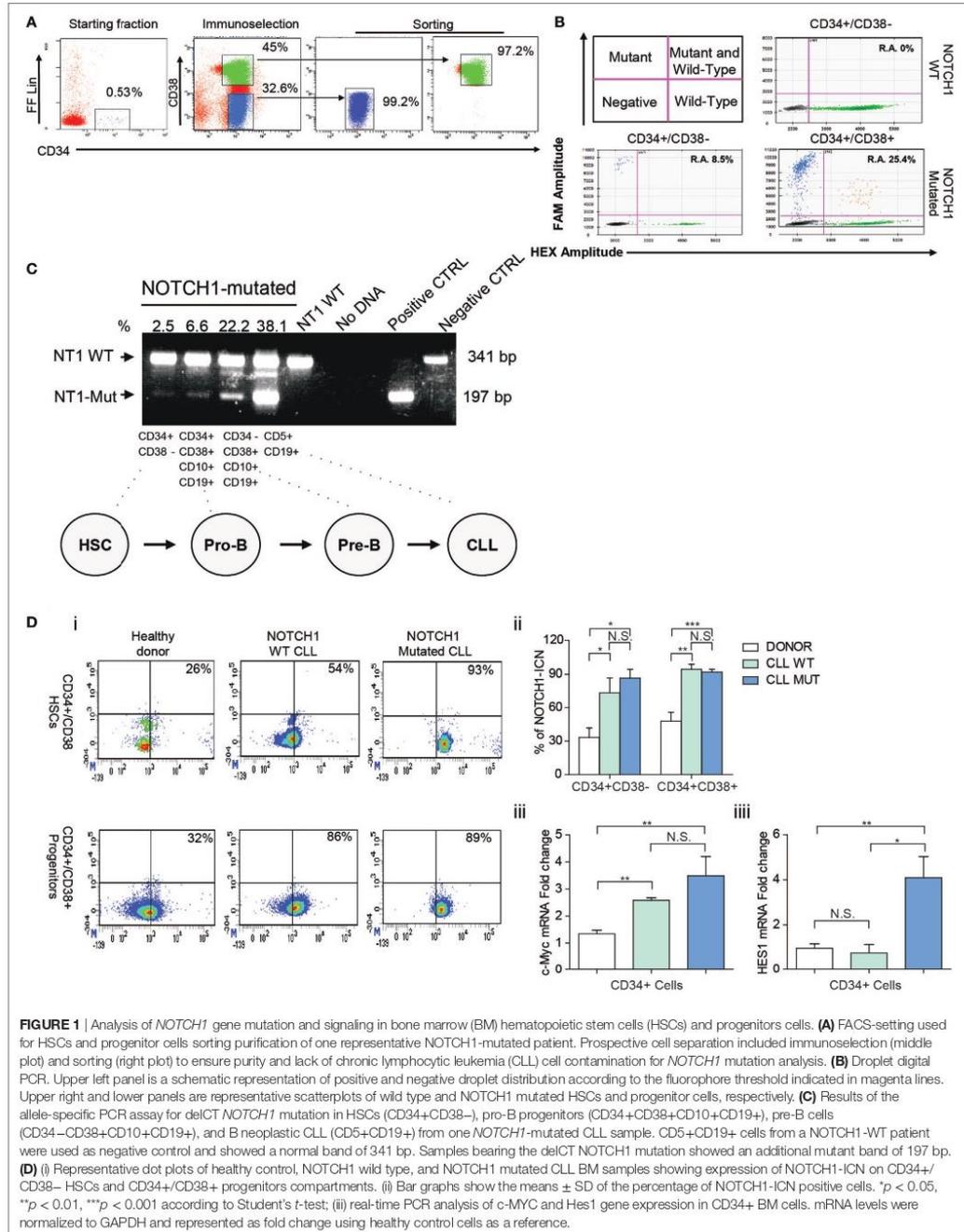
Statistical analyses were performed with GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). In the text, data are presented as mean  $\pm$  SD and statistical differences between mean values were evaluated using the Student's *t*-test and Mann–Whitney test.

## RESULTS

### HSCs From CLL Patients Showed *NOTCH1* Mutation

The mean proportion of BM CD34+ cells before enrichment was  $0.75 \pm 0.44\%$ . After the FACS sorting procedures, the mean purity of CD34+/CD38– cells was  $94.58 \pm 3.52\%$  and CD34+/CD38+ cells were  $98.12 \pm 1.34\%$  (Figure 1A).

We initially analyzed the *NOTCH1* mutational hotspot by Sanger sequencing. The CD34+/CD38– fraction did not contain *NOTCH1*-mutated cells. Then, a high sensitivity AS-PCR assay for the *NOTCH1* mutation (13) indicated the presence of small HSCs mutated clones in 57% CLL samples. Densitometric analysis revealed a mean  $6.4 \pm 4.7\%$  *NOTCH1* mutant allelic burden. Moreover, we used a ddPCR assay to validate *NOTCH1* mutational data in HSCs by a more quantitative method. We confirmed *NOTCH1* mutations in two HSCs samples for which DNA was available that display an allelic ratio of 2.6 and 8.5%, respectively (Figure 1B). Altogether, these data confirm that *NOTCH1* mutation is an early event in CLL hematopoiesis in a fraction of patients. Additionally, we measured the *NOTCH1* mutational burden along specific stages of HSC differentiation in *NOTCH1*-mutated CLL patients. The mean percentage of the mutant allele progressively increased from  $6.4 \pm 4.7\%$  in CD34+CD38– to  $14.9 \pm 11.3\%$  in CD34+CD38+CD10+CD19+ cells,  $22.7 \pm 6.5\%$  in CD34–CD38+CD10+CD19+ cells and  $40.5 \pm 4.3\%$  in neoplastic CD5+CD19+ cells (Figure 1C). The analysis of the rearrangement status of the IgH gene revealed in both *NOTCH1* mutated and *NOTCH1* unmutated CD34+CD38– HSCs the presence of a germline configuration in the half of the samples while the other 50% showed a clonal VDJ.



**FIGURE 1** | Analysis of *NOTCH1* gene mutation and signaling in bone marrow (BM) hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors cells. **(A)** FACS-setting used for HSCs and progenitor cells sorting purification of one representative *NOTCH1*-mutated patient. Prospective cell separation included immunoselection (middle plot) and sorting (right plot) to ensure purity and lack of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell contamination for *NOTCH1* mutation analysis. **(B)** Droplet digital PCR. Upper left panel is a schematic representation of positive and negative droplet distribution according to the fluorophore threshold indicated in magenta lines. Upper right and lower panels are representative scatterplots of wild type and *NOTCH1* mutated HSCs and progenitor cells, respectively. **(C)** Results of the allele-specific PCR assay for delCT *NOTCH1* mutation in HSCs (CD34+CD38-), pro-B progenitors (CD34+CD38+CD10+CD19+), pre-B cells (CD34-CD38+CD10+CD19+), and B neoplastic CLL (CD5+CD19+) from one *NOTCH1*-mutated CLL sample. CD5+CD19+ cells from a *NOTCH1*-WT patient were used as negative control and showed a normal band of 341 bp. Samples bearing the delCT *NOTCH1* mutation showed an additional mutant band of 197 bp. **(D)** (i) Representative dot plots of healthy control, *NOTCH1* wild type, and *NOTCH1* mutated CLL BM samples showing expression of *NOTCH1*-ICN on CD34+/CD38- HSCs and CD34+/CD38+ progenitors compartments. (ii) Bar graphs show the means ± SD of the percentage of *NOTCH1*-ICN positive cells. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 according to Student's *t*-test; (iii) real-time PCR analysis of *c-MYC* and *Hes1* gene expression in CD34+ BM cells. mRNA levels were normalized to *GAPDH* and represented as fold change using healthy control cells as a reference.

## HSCs From CLL Patients Have NOTCH1 Aberrantly Activated Also in Unmutated NOTCH1 Patients

Thus, we analyzed the NOTCH1 signaling status in HSCs and progenitor cells of NOTCH1-mutated and unmutated CLL samples. Physiologically, the active intracellular domain (ICN) of NOTCH1 accumulates in cells with activated NOTCH1 signaling as a result of a cleavage of the transmembrane (TM) subunit made by the  $\gamma$ -secretase complex (14). Here, we used flow cytometry to quantitate the percentage of active NOTCH1-ICN in CD34+/CD38- HSCs and CD34+CD38+ progenitors from the BM of CLL patients and HDs, used as control. As shown in **Figure 1Di,ii**, NOTCH1-ICN was significantly higher in CLL samples regardless the NOTCH1 mutational status compared to non-leukemic samples. Indeed, the mean percentage of CD34+/CD38- /NOTCH1-ICN+ and CD34+/CD38+/NOTCH1-ICN+ populations in NOTCH1 WT and mutated CLL was significantly higher than HDs samples ( $73.4 \pm 22.9$  and  $83 \pm 16.4$  vs  $33.3 \pm 14.8\%$ ;  $94.4 \pm 7.3$  and  $92.8 \pm 4.3$  vs  $47.9 \pm 13.8\%$ , respectively).

To demonstrate the capability of CD34+ CLL cells to activate NOTCH1 signaling pathway, we analyzed the levels of NOTCH1 downstream transcriptional target gene. It has been demonstrated that NOTCH1 controls c-MYC expression in mature CLL cells overexpressing the NOTCH1-ICN (12). Thus, using quantitative reverse transcription-PCR, we found significantly higher mRNA expression levels of c-MYC in CD34+ cells from NOTCH1 mutated and WT CLL samples compared to HD ( $3.5 \pm 0.7$  and  $2.6 \pm 0.08$  vs  $1.3 \pm 0.1$ ) (**Figure 1Di,iii**). In addition, we showed higher Hes1 expression in CD34+ cells from CLL patients compared to HD ( $4.2 \pm 1.1$  vs  $1.1 \pm 0.2$ ) (**Figure 1Di,iii**), in line with upregulated NOTCH1 pathway.

Next, we analyzed whether the higher levels of NOTCH1 activation in HSCs and progenitors CLL samples were accompanied with increased NOTCH1 expression. We analyzed by western blot the expression levels of NOTCH1-TM subunit in CD34+ cells from BM aspirates of four NOTCH1-mutated CLL patients and three HDs (6). The median purity of immunoselected CD34+ cells was 97.3% (range 74–99.5%; **Figure 2A**). Results revealed that CD34+ samples from CLL patients always expressed the NOTCH1-TM protein. Conversely, in CD34+ cells from HDs, NOTCH1-TM was either absent or expressed at lower levels than those observed in CLL samples (**Figure 2Bi,ii**). These data demonstrated that high levels of NOTCH1 signaling activation correlated with NOTCH1-TM overexpression in the CD34+ hematopoietic compartment of CLL.

## DISCUSSION

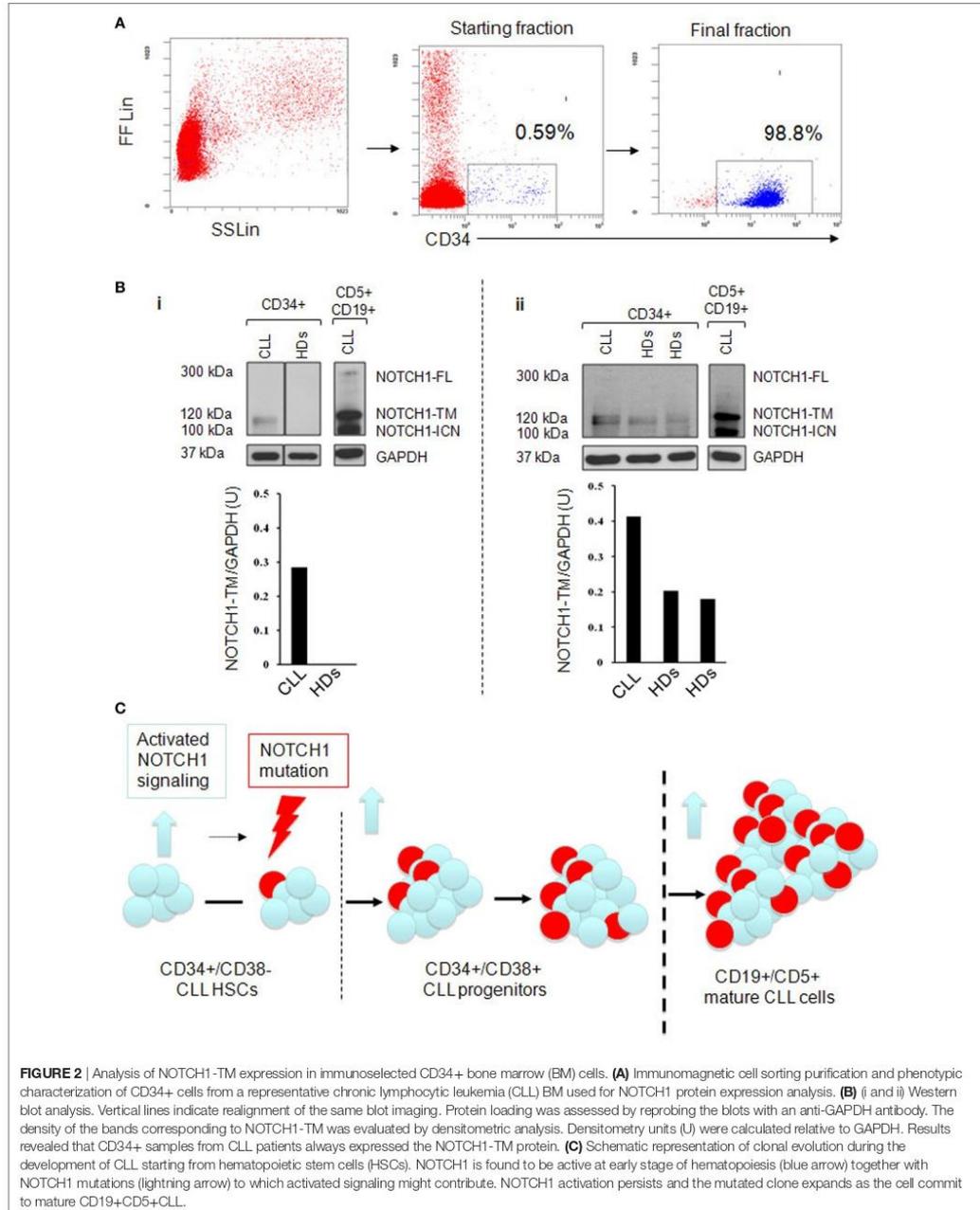
The Notch pathway is genetically altered in a large number of hematopoietic and solid tumors (15). We recently reported that activating mutations of NOTCH1 are recurrently associated with CLL and predict poor outcome (3, 4). The identification of a somatic NOTCH1 mutation could help providing additional information on the cellular origin of CLL. Sanger sequencing analysis (13) failed to detect mutations in CD34+/CD38- HSCs fractions of CLL patients. However, the sensitivity of this method

does not allow the identification of a mutation whose allelic representation is <10%. Thus, we used more sensitive PCR based methods in order to verify results obtained with direct sequencing.

The analysis of CD34+/CD38+ progenitors detected the NOTCH1 mutation in 57% of the samples. Damm et al. (8) described a similar frequency of NOTCH1 mutation in multipotent progenitors of CLL samples performing NGS analysis on rare CD34+CD19- peripheral blood cells. Recently, the same analysis was conducted in immunoselected CD34+ BM cells that resulted NOTCH1-mutated in 8 out of 13 CLL samples (9). Here, we used two high sensitive PCR assays specific for NOTCH1 mutation and employed FACS sorted CD34+CD38+ cells from BM aspirates. Additionally, we showed here that the NOTCH1 mutational burden increased along specific stages of HSC differentiation in NOTCH1-mutated CLL patients. This suggests that the NOTCH1 lesion is selected and expands during HSC differentiation toward a B neoplastic cell, thus strengthening the hypothesis that the genetic alteration is an initial event associated with the stepwise malignant transformation of CLL.

In normal human BM, CD34+CD38- populations do not rearrange the IgH gene (16), thus raising issues on the molecular purity of the sorted hematopoietic cell fractions presenting a VDJ rearrangement. Nevertheless, the high purity of HSC double-sorted samples together with the sensitivity of the IgH method (5%) limited the risk of detecting small fractions of contaminating neoplastic B cells. The alternative option is that IgH rearrangement is the expression of a B neoplastic transactivation at the HSC level.

Recently, common nonmutational NOTCH1 activation has been described in mature CLL cells (12) raising the question of whether the same condition is present in HSCs to determine their aberrant behavior. The Notch1 signaling has been extensively analyzed in the context of embryonic hematopoiesis. *Ex vivo* approaches suggest that Notch signaling can expand HSCs, raising the question of whether this is a physiologic Notch function. Gerhardt et al. (17) correlated NOTCH1 with hematopoiesis in animal models and identified cell-autonomous functions for Notch1 signaling in fetal HSCs homeostasis. The present study indicated that the pool of CD34+ cells, including HSC and progenitor compartments, tend to have NOTCH1 aberrantly expressed and activated in CLL patients compared to HDs. NOTCH1 deregulation and overexpression of c-Myc are independent of NOTCH1 mutational status. These data clearly show that expansion of the leukemic stem cell clone does not necessarily require a mutation to upregulate the NOTCH1 signaling, suggesting the presence of extrinsic factors from the BM HSC niche that are capable of stimulating and promoting CLL-initiating cell clone expansion. In CLL patients, BM mesenchymal cells express different ligands, which might play a role in NOTCH1 activation (18). However, additional studies are warranted to compare the levels and type of these ligands in the BM of healthy people vs CLL patients. Alternatively, CLL-HSCs may have cell-intrinsic mechanisms activating NOTCH1, which involve alterations of NOTCH1 pathway regulators (19, 20) or aberrant regulation of NOTCH1 receptor recycling (21). This selective pressure might contribute to the onset of specific NOTCH1 mutations in a DNA context that is prone to spontaneous microdeletion (5) (**Figure 2C**).



**FIGURE 2** | Analysis of NOTCH1-TM expression in immunoselected CD34+ bone marrow (BM) cells. **(A)** Immunomagnetic cell sorting purification and phenotypic characterization of CD34+ cells from a representative chronic lymphocytic leukemia (CLL) BM used for NOTCH1 protein expression analysis. **(B)** (i and ii) Western blot analysis. Vertical lines indicate realignment of the same blot imaging. Protein loading was assessed by reprobing the blots with an anti-GAPDH antibody. The density of the bands corresponding to NOTCH1-TM was evaluated by densitometric analysis. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH. Results revealed that CD34+ samples from CLL patients always expressed the NOTCH1-TM protein. **(C)** Schematic representation of clonal evolution during the development of CLL starting from hematopoietic stem cells (HSCs). NOTCH1 is found to be active at early stage of hematopoiesis (blue arrow) together with NOTCH1 mutations (lightning arrow) to which activated signaling might contribute. NOTCH1 activation persists and the mutated clone expands as the cell commit to mature CD19+CD5+CLL.

Our discovery of *NOTCH1* deregulated signal and mutations in CLL-HSC have significant therapeutic implications in this disease. A variety of approaches was used to inhibit NOTCH1 for cancer therapy, including presenilin  $\gamma$ -secretase inhibitors, trafficking modulators (22), and blocking antibodies. In the next future, it will be interesting to evaluate the effects of these anti-NOTCH1 drugs in the development of CD34+CD38- and CD34+CD38+ CLL populations.

In conclusion, our data confirmed the presence of *NOTCH1* mutations in HSCs of CLL patients and showed for the first time a common nonmutational NOTCH1 activation occurring early in CLL hematopoiesis and represent a rationale for the use of therapies targeting the NOTCH1 signaling in CLL aimed to inhibit the survival of CLL-initiating cells.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of University/Hospital of Perugia guidelines, Ethics Committee of Perugia, with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Ethics Committee of Perugia.

## REFERENCES

- Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Br J Haematol* (2011) 117:1781–91. doi:10.1182/blood-2010-07-155663
- Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* (2011) 20:246–59. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.029
- Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, Martelli MF, et al. A new genetic lesion in B-CLL: a NOTCH1 PEST domain mutation. *Br J Haematol* (2009) 146:689–91. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07816.x
- Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* (2010) 151:404–6. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08368.x
- South AP, Cho RJ, Aster JC. The double-edged sword of Notch signaling in cancer. *Sem Cell Dev Biol* (2012) 23:458–64. doi:10.1016/j.semdb.2012.01.017
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* (2009) 113:856–65. doi:10.1182/blood-2008-02-139725
- De Falco F, Sabatini R, Del Papa B, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P, et al. Notch signaling sustains the expression of Mcl-1 and the activity of eIF4E to promote cell survival in CLL. *Oncotarget* (2015) 6:16559–72. doi:10.18632/oncotarget.4116
- Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov* (2014) 4:1088–101. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0104
- Quijada-Álamo M, Hernández-Sánchez M, Robledo C, Hernández-Sánchez JM, Benito R, Montaña A, et al. Next-generation sequencing and FISH studies reveal the appearance of gene mutations and chromosomal abnormalities in hematopoietic progenitors in chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol* (2017) 10:83. doi:10.1186/s13045-017-0450-y
- Rossi FM, Zucchetto A, Tissino E, Dal Bo M, Bomben R, Caldana C, et al. CD49d expression identifies a chronic-lymphocytic leukemia subset with high levels of mobilized circulating CD34(+) hemopoietic progenitors cells. *Leukemia* (2014) 28:705–8. doi:10.1038/leu.2013.331

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MDI and PS designed experiments; SB, BDP, PA, ED, FDF, ADT, RG, PA, GR, CR, ESB, and AFC performed experiments and analyzed data; EA and FF contributed to samples collection; MDI, ER, BDP, IS, and PS wrote the manuscript.

## FUNDING

This study was supported by grants from MIUR (Scientific Independence of young Researchers 2014 Grant No. RBSI14GPBL to PS and Progetti di Ricerca di Interesse Nazionale 2010–2011 Grant No. 2010MCLPLB to IS), AIRC (My First AIRC Grant No. 17442 to PS), the Gilead Fellowship Program 2017 to PS. “Associazione Umbra Leucemie e Linfomi,” Perugia, Italy; “Associazione Italiana Leucemie, Linfomi e Mieloma,” L’Aquila Section, Italy.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00105/full#supplementary-material>.

- Kluk MJ, Ashworth T, Wang H, Knoechel B, Mason EF, Morgan EA, et al. Gauging NOTCH1 activation in cancer using immunohistochemistry. *PLoS One* (2013) 8:e67306. doi:10.1371/journal.pone.0067306
- Fabbri G, Holmes AB, Viganotti M, Scuoppo C, Belver L, Herranz D, et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114:E2911–9. doi:10.1073/pnas.1702564114
- Sportoletti P, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, Ruggeri L, et al. A revised NOTCH1 mutation frequency still impacts survival while the allele burden predicts early progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* (2014) 28:436–9. doi:10.1038/leu.2013.289
- De Falco F, Sabatini R, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P, Baldoni S, et al. Constitutive phosphorylation of the active Notch1 intracellular domain in chronic lymphocytic leukemia cells with NOTCH1 mutation. *Leukemia* (2015) 29:994–8. doi:10.1038/leu.2014.329
- Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell* (2014) 25:318–34. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.018
- Davi F, Fali A, Gritti C, Blanc C, Laurent S, Sutton L, et al. Early onset of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in normal human bone marrow CD34+ cells. *Blood* (1997) 90:4014–21.
- Gerhardt DM, Pajcini KV, D’Altri T, Tu L, Jain R, Xu L, et al. The Notch1 transcriptional activation domain is required for development and reveals a novel role for Notch1 signaling in fetal hematopoietic stem cells. *Genes Dev* (2014) 28:576–93. doi:10.1101/gad.227496.113
- Nwabo Kamdje AH, Bassi G, Pacelli L, Malpeli G, Amati E, Nichele I, et al. Role of stromal cell-mediated notch signaling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood Cancer J* (2012) 2(5):e73. doi:10.1038/bcj.2012.17
- Baldoni S, Sportoletti P, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, Rosati E, et al. NOTCH and NF- $\kappa$ B interplay in chronic lymphocytic leukemia is independent of genetic lesion. *Int J Hematol* (2013) 98:153–7. doi:10.1007/s12185-013-1368-y
- Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abriñ J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* (2015) 526:519–24. doi:10.1038/nature14666
- Le Bras S, Loyer N, Le Borgne R. The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic* (2011) 12:149–61. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01126.x

22. Baldoni S, Del Papa B, Dorillo E, Aureli P, De Falco F, Rompietti C, et al. Bepiridil exhibits anti-leukemic activity associated with NOTCH1 pathway inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* (2018). doi:10.1002/ijc.31355

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Di Ianni, Baldoni, Del Papa, Aureli, Dorillo, De Falco, Albi, Varasano, Di Tommaso, Giancola, Accorsi, Rotta, Rompietti, Silva Barcelos, Campese, Di Bartolomeo, Screpanti, Rosati, Falzetti and Sportoletti. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CCBY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Decreased NOTCH1 Activation Correlates with Response to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia

Beatrice Del Papa<sup>1</sup>, Stefano Baldoni<sup>1,2</sup>, Erica Dorillo<sup>1</sup>, Filomena De Falco<sup>1</sup>, Chiara Rompietti<sup>1</sup>, Debora Cecchini<sup>1</sup>, Maria Grazia Cantelmi<sup>1</sup>, Daniele Sorcini<sup>1</sup>, Manuel Nogarotto<sup>1</sup>, Francesco Maria Adamo<sup>1</sup>, Federica Mezzasoma<sup>1</sup>, Estevão Carlos Silva Barcelos<sup>1,3</sup>, Elisa Albi<sup>1</sup>, Roberta Iacucci Ostini<sup>1</sup>, Ambra Di Tommaso<sup>2</sup>, Andrea Marra<sup>1</sup>, Guido Montanaro<sup>1,4</sup>, Maria Paola Martelli<sup>1</sup>, Franca Falzetti<sup>1</sup>, Mauro Di Ianni<sup>4,5</sup>, Emanuela Rosati<sup>6</sup>, and Paolo Sportoletti<sup>1</sup>

### Abstract

**Purpose:** Ibrutinib, a Bruton tyrosine kinase inhibitor (BTKi), has improved the outcomes of chronic lymphocytic leukemia (CLL), but primary resistance or relapse are issues of increasing significance. While the predominant mechanism of action of BTKi is the B-cell receptor (BCR) blockade, many off-target effects are unknown. We investigated potential interactions between BCR pathway and NOTCH1 activity in ibrutinib-treated CLL to identify new mechanisms of therapy resistance and markers to monitor disease response.

**Experimental Design:** NOTCH1 activation was evaluated either *in vitro* and *ex vivo* in CLL samples after ibrutinib treatment by Western blotting. Confocal proximity ligation assay (PLA) experiments and analyses of down-targets of NOTCH1 by qRT-PCR were used to investigate the cross-talk between BTK and NOTCH1.

**Results:** *In vitro* ibrutinib treatment of CLL significantly reduced activated NOTCH1/2 and induced dephosphory-

lation of eIF4E, a NOTCH target in CLL. BCR stimulation increased the expression of activated NOTCH1 that accumulated in the nucleus leading to HES1, DTX1, and c-MYC transcription. Results of *in situ* PLA experiments revealed the presence of NOTCH1-ICD/BTK complexes, whose number was reduced after ibrutinib treatment. In ibrutinib-treated CLL patients, leukemic cells showed NOTCH1 activity downregulation that deepened over time. The NOTCH1 signaling was restored at relapse and remained activated in ibrutinib-resistant CLL cells.

**Conclusions:** We demonstrated a strong clinical activity of ibrutinib in a real-life context. The ibrutinib clinical efficacy was associated with NOTCH1 activity downregulation that deepened over time. Our data point to NOTCH1 as a new molecular partner in BCR signaling with potential to further improve CLL-targeted treatments.

<sup>1</sup>Institute of Hematology-Centro di Ricerca Emato-Oncologica (CREO), University of Perugia, Perugia, Italy. <sup>2</sup>Department of Life, Health and Environmental Sciences, Hematology Section, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy. <sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Postgraduate Program in Biotechnology (UFES), Federal University of Espírito Santo, Vitória-ES, Brazil. <sup>4</sup>Department of Hematology, Transfusion Medicine and Biotechnologies, Ospedale Civile, Pescara, Italy. <sup>5</sup>Department of Medicine and Aging Sciences, University of Chieti Pescara, Chieti, Italy. <sup>6</sup>Department of Experimental Medicine, Biosciences and Medical Embriology Section, University of Perugia, Perugia, Italy.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

B. Del Papa and S. Baldoni contributed equally to this article.

**Corresponding Author:** Paolo Sportoletti, University of Perugia, Piazzale Severi, Perugia 06132, Italy. Phone: 0039-075-578-2447; Fax: 0039-075-578-4109; E-mail: paolo.sportoletti@unipg.it

Clin Cancer Res 2019;25:7540-53

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1009

©2019 American Association for Cancer Research.

### Introduction

Recent years have shown a rapid expansion in our knowledge on the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL; ref. 1). This field of research has provided essential information for the development of innovative chemotherapy-free treatments.

Aberrant B-cell receptor (BCR) signaling is one of the mechanisms controlling survival of CLL cells (2). The Bruton tyrosine kinase (BTK), a key proximal kinase in the BCR pathway, is constitutively activated in CLL representing an ideal therapeutic target (3). Small-molecule inhibition of BTK represents a revolution in CLL management. Ibrutinib is the first-in-class drug for CLL treatment that irreversibly binds to the BTK activation site determining the inhibition of this enzyme (4). BTK inhibition reduced proliferation, survival, and migration of CLL cells to their growth-promoting microenvironment. Ibrutinib has been used as monotherapy for first-line and relapsed/refractory (R/R) CLL, with high response rates and prolonged progression-free (PFS) and overall survival (OS; ref. 5). Despite ibrutinib's activity in CLL, molecular effects other than BTK blocking are currently under investigation and drug resistance remains a challenge.

### Translational Relevance

B-cell receptor (BCR) signaling plays an integral role in B-cell malignancies' development, representing a suitable target for innovative therapy in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Thus, the identification of molecular mechanisms underlying BCR inhibition and novel interaction partners of the BCR has the potential to further improve CLL-targeted treatments. We suggest that active Bruton tyrosine kinase (BTK) interacts with NOTCH1-ICD to maintain its levels, and that ibrutinib leads to NOTCH1-intracellular domain (ICD) downregulation by causing weakening of NOTCH1-ICD/BTK interactions. We demonstrated that the therapeutic response to ibrutinib is associated with the decrease of NOTCH1 activation, an important pathway for CLL pathogenesis. Our data point to the assessment of NOTCH1-ICD levels as a new marker of disease response and indicate NOTCH1 activation as an alternative mechanism underlying acquired resistance, independent of *BTK/PLCG2* mutations. It could therefore be advantageous to monitor NOTCH1 activation status in CLL under ibrutinib treatment for early detection of resistant clones and eventually inform further treatment choices. All these findings not only provide further support to ibrutinib therapy optimization, but also for its exploration in combination with anti-NOTCH1 agents in the setting of primary or acquired resistance.

Although the majority of ibrutinib-resistant CLL harbors *BTK* or *PLCG2* mutations (6), the identification of new molecular mechanisms of drug resistance will further improve CLL target treatment.

There is growing evidence that links CLL to activated NOTCH signaling (7, 8). CLL cells have a constitutive NOTCH1 and NOTCH2 activation contributing to apoptosis resistance (9). This finding led to the discovery of *NOTCH1* mutations in a fraction of patients with CLL with poor clinical outcome (10–14). Next-generation sequencing demonstrated that *NOTCH1* is one of the most frequently altered gene in the mutational landscape of CLL (15–17). *NOTCH1* mutations have a stabilizing effect on the NOTCH1 signaling of CLL cells that explains the constitutive pathway activation in 10%–20% mutated patients (18–21). More recently, it has been described a mechanism of NOTCH1 activation independent of the mutational status, based on the higher frequency of signaling activity compared with the incidence of the genetic lesion (22, 23). Altogether these findings indicated that NOTCH1 represents a key target in current and future CLL-tailored therapy.

To date, a functional interplay between the BCR and NOTCH1 signaling in CLL setting has never been investigated. Here, we discovered a novel inhibitory effect of ibrutinib against NOTCH1 activity *in vitro* and *in vivo*. We assessed the interaction between BCR stimulation and NOTCH1 pathway in primary CLL cells. In addition, we correlated the anti-NOTCH1 effects of ibrutinib to drug efficacy using the evaluation of NOTCH1 activity as a marker of disease monitoring and evolution. Our data will have the potential to further improve CLL treatments and to implement the use of current targeted agents against the BCR-associated BTK in CLL.

### Materials and Methods

#### Patients

Peripheral blood (PB) samples from patients with CLL were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and under the approval of the specific local ethics committee (approval 2015–001 of the University of Perugia, Perugia, Italy). Clinical and biological characteristics are summarized in Supplementary Table S1.

#### CLL cells' isolation, culture, and stimulation

Neoplastic B cells were obtained from the blood of patients with CLL using Ficoll density-gradient centrifugation followed by sheep erythrocyte rosetting. This procedure allowed the separation of highly purified nonrosetting B leukemic cells from rosetting T cells. The average purity of CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> cells was 93.8% ± 2.7% as determined by flow cytometry (EPICS-XLMCL; Beckman Coulter) analysis using anti-CD45, CD19, CD5, CD11b, CD3 mAbs on 7AAD negative (all from Beckman Coulter). Cells were used fresh or viably frozen. Purified B cells were plated at 2 × 10<sup>6</sup>/mL in RPMI1640 media supplemented with 10% heat-inactivated human serum (FBS, Gibco-BRL), 2 mmol/L L-glutamine, and 100 U/mL penicillin/100 µg/mL streptomycin and were cultured in the presence or absence of DMSO (vehicle control), ibrutinib 1 or 10 µmol/L (ref. 24; PCI-32765 Selleckchem), and bepridil 2.5 µmol/L (ref. 25; Sigma-Aldrich) for 24 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. For experiments examining survival signals including stromal cocultures, HS-5 stromal cells (ATCC CRL-11882) were seeded at a concentration of 60,000 cells (80%–100% confluent) per well in 24-well plates, were incubated for 24 hours to allow cells to adhere, and 10<sup>6</sup> CLL cells were then added to the confluent layers of stromal cells in complete RPMI medium for 24 hours. For BCR stimulation experiments, isolated B-CLL cells from IGHV-unmutated patients were stimulated for 15 minutes with 10 µg/mL soluble AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG+IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and collected for the analysis of BTK phosphorylation and cleaved NOTCH1-ICD at the protein level. The transcriptional activity of NOTCH1-ICD was determined after 6-hour stimulation measuring the mRNA levels of NOTCH1 target genes.

#### Flow cytometry

Cell viability/apoptosis were assessed by flow cytometry after Annexin V-FITC/propidium iodide staining (Immunotech, Beckman Coulter). Results were expressed as the percentage of viable [Annexin V (AnV)–/propidium iodide (PI)–] or late apoptotic [AnV+/PI+] over vehicle-treated control. The analysis of NOTCH1 surface expression was performed using an anti-NOTCH1-PE antibody (clone 527425, R&D Systems) or isotype control (mouse IgG1) gating on CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> cells.

#### siRNA transfection

Transfection experiments were performed both in primary samples and in the PGA-1 (ACC 766) CLL cell line obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Cells were transfected using the Amaxa Nucleofection Technology (Amaxa) and the ON-TARGETplus SMARTpool small-interfering RNA (siRNA) to total BTK (siBTK) or ON-

Del Papa et al.

TARGETplus siCONTROL nontargeting pool (siCtrl) as negative control (Dharmacon RNA Technologies). CLL cells ( $12 \times 10^6$ ) were resuspended in 100  $\mu$ L Cell Line Solution Kit V (Lonza Group Ltd) with 0.25  $\mu$ mol/L of siBTK or siCtrl, transferred to the provided cuvettes and transfected with the Amaxa Nucleofector II device (program U-013). Cells were immediately transferred into 12-well plates in complete medium, and after 72 hours were examined for the expression of NOTCH1-ICD and BTK protein to verify the efficiency of silencing.

#### Western blotting

Whole-cell lysates were extracted as reported previously (9). Subcellular fractionation was performed using a NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions. Western blotting was performed using the primary antibodies detailed in Supplementary Table S2. Densitometric analysis was done using Quantity One software.

#### Confocal immunofluorescence microscopy

Cells ( $2 \times 10^5$ ) were seeded on poly-L-lysine-coated micro coverslips and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature. Cells were then permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS for 5 minutes at room temperature. After three washes in PBS with Triton X-100 (0.01%), cells were blocked with blocking buffer (1% BSA in PBS) for 30 minutes before 1-hour incubation at room temperature with rabbit anti-NOTCH1 (Val1744) and mouse anti-BTK antibodies (Supplementary Table S2) diluted in blocking buffer. After three washes in PBS with Triton X-100 (0.01%), cells were incubated with goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 and goat anti-mouse Alexa-Fluor 568 for 40 minutes in the dark. Nuclei were stained with 4,6-Diamidino-2-phenyl indole (DAPI) in ProLong Gold antifade mounting reagent (Thermo Fisher Scientific). Images were acquired with a laser scanning confocal microscope LSM 800 with Airyscan (Zeiss) using a 63 $\times$  oil immersion and 1.4 NA objective (scale bar, 10  $\mu$ m).

#### Proximity ligation assay

The *in situ* proximity ligation assay (PLA) was applied to examine the interaction between NOTCH1-intracellular domain (ICD) and BTK in patients with CLL with positive ICD of NOTCH1, referred to as ICN1+. PLA was performed on fixed primary CLL cells with Duolink PLA technology probes and reagents (Sigma-Aldrich), and following the manufacturer's protocol. Briefly, B cells from patients with CLL were permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, then blocked in 1% BSA, 0.01% Triton X-100 in PBS, and incubated with rabbit anti-NOTCH1 (Val1744) and mouse anti-BTK antibodies (Supplementary Table S2). Incubation with Duolink MINUS and PLUS probes conjugated to secondary antibody, ligation, and amplification steps for PLA were performed as suggested by the manufacturer using 40- $\mu$ L volume reaction. Following amplification, slides were washed for 10 minutes in Buffer A and B, and mounted with Duolink In Situ Mounting Medium containing DAPI. Negative controls were obtained by omitting primary antibodies. Fluorescent images were obtained using a confocal microscope LSM 800 (Zeiss) with Airyscan using a 63 $\times$  oil immersion and 1.4 NA objective (scale bar, 10  $\mu$ m). Ten fields were analyzed.

#### Real-time qPCR

RNA was extracted using RNeasy Plus Kits (Qiagen) and cDNA was obtained using Prime Script RT Master Mix (Takara Bio). We used the PCR Master Mix PowerSYBER Green and the 7900HT fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The primer sequences are included in Supplementary Table S3. Relative fold change was normalized to GAPDH and calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method.

#### Droplet digital PCR

NOTCH1 probe assays (dHsaCP2500500 and dHsaCP2500501, Bio-Rad) were used to determinate the allelic burden of NOTCH1. The droplet generated included DNA, NOTCH1 probes assays (1 $\times$ ), and ddPCR Supermix (2 $\times$ ) for Probes (no dUTP; Bio-Rad). The mix was amplified by PCR and analyzed by QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Scatterplots depict droplet digital PCR (ddPCR) results specifically for the NOTCH1 mutation assay.

#### Genetic analysis

Genomic DNA was extracted with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Genetic alterations analysis was performed accordingly to previously published protocols (25–27).

Specifically, the NOTCH1 mutation screening was performed using an allele-specific PCR method with two external primers as internal PCR control and a third primer specific for the mutation (25). BTK and PLCC2 mutations were detected by Sanger sequencing methods using primer sequences included in Supplementary Table S3. IGHV mutational status was analyzed according to ERIC recommendations (28).

#### Statistical analysis

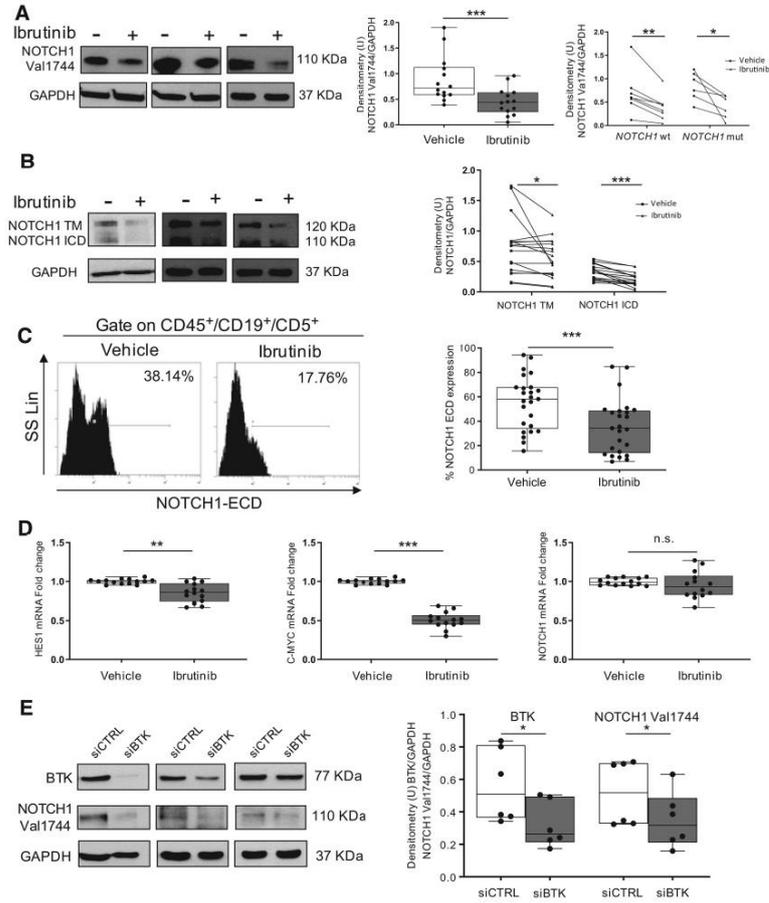
Statistical analyses were performed with GraphPad Software. Statistical differences between mean values were evaluated using nonparametric tests as Wilcoxon for paired data and Mann-Whitney for nonpaired data. One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test was performed to test significant differences between multiple groups. Survival was calculated from the start of ibrutinib to the date of progression (PFS) or death (OS) using the Kaplan–Meier method.

## Results

### BCR inhibition by ibrutinib impairs NOTCH signaling in CLL cells *in vitro*

To investigate whether BTK suppression affected the NOTCH1 pathway *in vitro*, we treated for 24 hours with ibrutinib 10  $\mu$ mol/L primary CLL cells exhibiting activated intracellular form of NOTCH1, referred to as ICN1+ CLL ( $N = 14$ ). NOTCH1 activation levels were measured by Western blotting using the anti-NOTCH1 (Val1744) antibody, which recognizes the cleaved NOTCH1 ICD starting at Val1744. Notably, ibrutinib-treated CLL showed a significant lower expression of NOTCH1-ICD compared with cells cultured with vehicle ( $P < 0.001$ ; Fig. 1A, left and middle). Our data demonstrated a significant NOTCH1-ICD reduction in both NOTCH1-mutated ( $N = 6$ ;  $P < 0.05$ ) and NOTCH1 wild-type samples ( $N = 8$ ;  $P < 0.01$ ; Fig. 1A, right) treated with ibrutinib compared with vehicle.

We further confirmed this inhibitory effect using an antibody against all forms of NOTCH1 ( $N = 17$ ) that showed significant NOTCH1-ICD downregulation ( $P < 0.001$ ) associated with lower



**Figure 1.** The antitumor efficacy of ibrutinib was associated with inhibition of NOTCH1 activity *in vitro*. **A**, The representative blots of the activated NOTCH1-ICD [NOTCH1 (Val1744)] protein levels in CLL cells treated with ibrutinib (10 μmol/L) for 24 hours compared with vehicle controls (DMSO). The box-and-whisker plot with data points in the middle panel shows densitometric Western blot data in the total cohort of patients with CLL (N = 14, left). Dot and line diagram of the densitometric Western blot data analyzed in the context of NOTCH1 wild-type (wt; N = 8) and NOTCH1-mutated (mut; N = 6) patients with CLL. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH (right). **B**, The representative blots using an antibody against the TM and ICD forms of NOTCH1 protein in CLL cells treated with ibrutinib (10 μmol/L) for 24 hours compared with vehicle controls (DMSO, left). Dot and line diagram of the densitometric Western blot data of 17 patients. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH (right). **C**, Representative flow cytometry histogram of the percentage of the extracellular domain (ECD) of NOTCH1 in CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> CLL cells incubated for 24 hours with ibrutinib (10 μmol/L) or vehicle control (DMSO, left). The box-and-whisker plot with data points in the right panel shows NOTCH1-ECD fluorescence in 25 patients. **D**, Box-and-whisker plots with data points show the analysis of HES1 (left), c-MYC (middle), and NOTCH1 (right) mRNA in CLL cells treated with ibrutinib (10 μmol/L) for 6 hours (N = 14). mRNA levels were normalized to GAPDH and represented as fold change using vehicle control (DMSO) cells as a reference. \*\*\*, P < 0.001; \*\*, P < 0.01; \*, P < 0.05; and n.s., not significant (ibrutinib vs. vehicle) according to Wilcoxon paired test. **E**, The representative blots of total BTK and activated NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] protein levels in the PGA-1 CLL cell line (left blot) and two primary samples (middle and right blots) transfected with control siRNA (siCtrl) or BTK siRNA (siBTK; left). The box-and-whisker plot with data points in the right shows densitometric Western blot data of six independent experiments. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH. \*, P < 0.05 (siBTK vs. siCtrl) according to Wilcoxon paired test.

Del Papa et al.

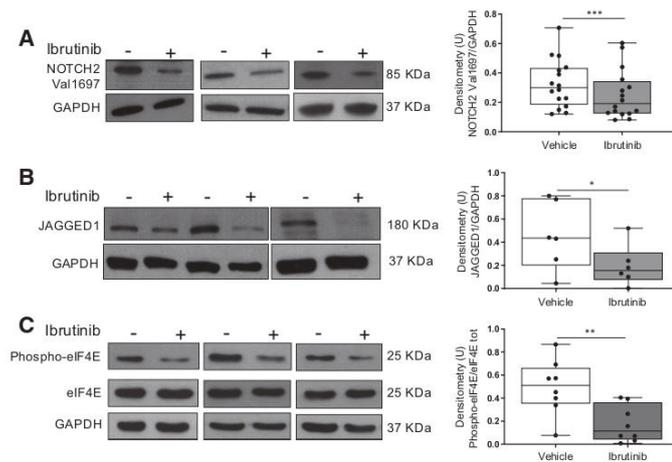
transmembrane (TM) domain levels ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B). In addition, flow cytometry demonstrated that also the percentage of the extracellular domain (ECD) of NOTCH1 ( $N = 25$ ) was significantly reduced in ibrutinib-treated CLL compared with vehicle ( $P < 0.001$ ; Fig. 1C). The impaired NOTCH1 activity was associated with a significant reduction of HES1 ( $P < 0.01$ ) and c-MYC ( $P < 0.001$ ) mRNA levels ( $N = 14$ ; Fig. 1D, left and middle), well-known downstream targets of the NOTCH1 signaling pathway. Conversely, NOTCH1 mRNA expression was similar in CLL cells treated with ibrutinib and vehicle ( $N = 14$ ; Fig. 1D, right), suggesting that NOTCH1 transcription was not affected. The inhibitory effects of ibrutinib on the levels of different subunits of the NOTCH1 protein and on the mRNA expression of its target genes were independent of the IGHV mutational status of CLL cells, being similar in both IGHV-mutated and unmutated samples (Supplementary Fig. S1A–S1D). Given the key role of microenvironmental signals in increasing NOTCH1 signaling, we tested the anti-NOTCH1 activity of ibrutinib in CLL cultured on a stromal layer ( $N = 6$ ). As shown in Supplementary Fig. S2, the effects of BTK inhibition preserved the capacity to switch-off NOTCH1 under coculture conditions ( $P < 0.05$ ).

To exclude potential nonspecific effects of ibrutinib, we downregulated the expression of total BTK protein in the PGA-1 CLL cell line and primary samples using siRNA. CLL cells were treated with BTK siRNA (siBTK), cultured for 48 hours

in complete medium, and then analyzed for total BTK and NOTCH1-ICD expression ( $N = 6$ ). As shown in Fig. 1E, the reduction of BTK expression induced by siBTK was accompanied by decreased levels of NOTCH1-ICD suggesting a crosstalk between BTK and NOTCH1 signaling. In keeping with these results, we demonstrated that ibrutinib maintained the ability to significantly reduce ( $P < 0.05$ ) NOTCH1-ICD ( $N = 7$  and  $N = 6$ ; Supplementary Fig. S3A and S3B, respectively), NOTCH1-TM ( $N = 6$ ; Supplementary Fig. S3B) and NOTCH1-ECD ( $N = 10$ ; Supplementary Fig. S3C) even when used at  $1 \mu\text{mol/L}$ , the concentration required to inhibit BTK activity in CLL cells *in vitro*.

Besides NOTCH1 activation, CLL constitutively overexpressed active NOTCH2 along with higher levels of JAGGED1 ligand compared with normal B cells (9, 29). We demonstrated that ibrutinib efficiently reduced the levels of both activated NOTCH2 ( $N = 16$ ;  $P < 0.001$ ) and JAGGED1 ( $N = 6$ ;  $P < 0.05$ ) expression in CLL, compared with vehicle after 24-hour treatment (Fig. 2A and B).

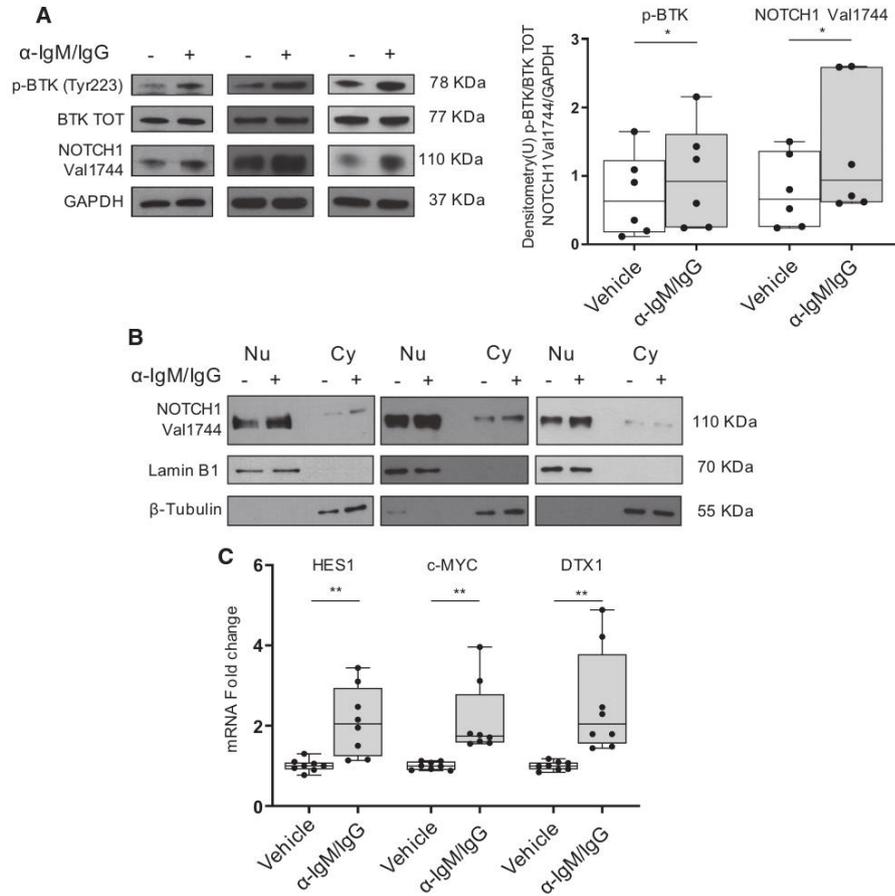
We recently demonstrated that NOTCH1/2 targeting is accompanied by reduced phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E; ref. 30), suggesting that this protein is another NOTCH target in CLL. To further demonstrate the anti-NOTCH activity of ibrutinib, we examined its effect on eIF4E phosphorylation ( $N = 8$ ). As shown in Fig. 2C, ibrutinib treatment reduced the levels of



**Figure 2.**

Effects of ibrutinib on NOTCH2 activity, JAGGED1 expression and eIF4E phosphorylation. **A**, Representative blots (left) and quantitative densitometry analysis (right; box-and-whisker plot with data points,  $N = 16$ ) of the activated ICD of NOTCH2 [NOTCH2(Val1697)] protein levels in CLL cells treated with ibrutinib ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours compared with vehicle controls. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH. **B**, Representative blot (left) and quantitative densitometry analysis (right; box-and-whisker plot with data points,  $N = 6$ ) of JAGGED1 protein levels in CLL cells treated with ibrutinib ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours compared with vehicle controls. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH. **C**, Representative blots (left) and quantitative densitometry analysis (right; box-and-whisker plot with data points,  $N = 8$ ) of total and phosphorylated forms of eIF4E protein levels in CLL cells treated with ibrutinib ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours compared with vehicle controls. Densitometry units (U) were calculated relative to total eIF4E. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*,  $P < 0.05$  (ibrutinib vs. vehicle) according to Wilcoxon paired test.

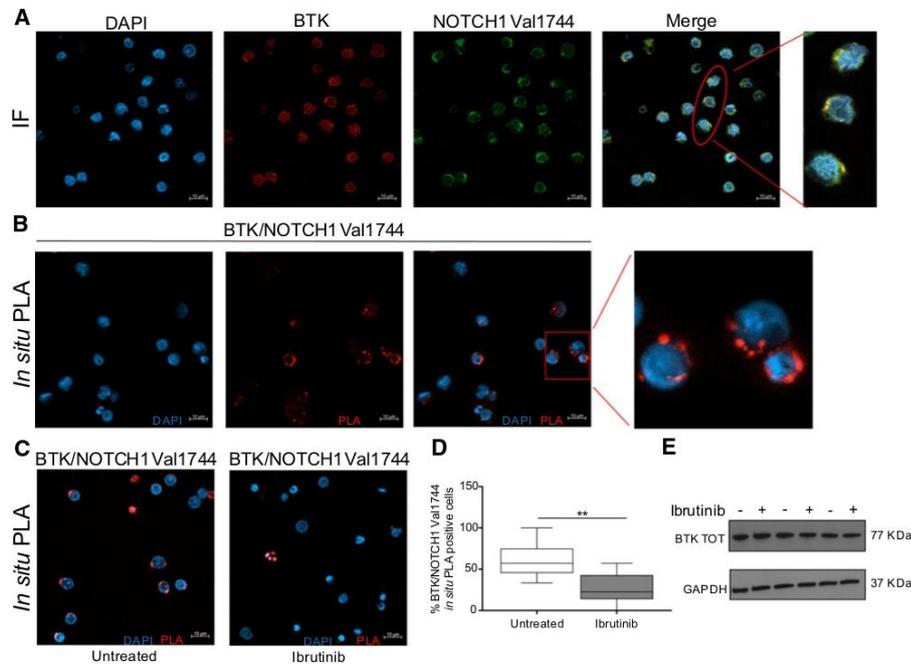
Role of NOTCH1 Activity in Ibrutinib-Treated CLL



**Figure 3.** BCR stimulation enhances NOTCH1 signaling activation in CLL cells. **A**, The representative blots of phosphorylated BTK (p-BTK), total BTK, and activated NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] performed on whole-cell lysates of IgM/IgG stimulated and unstimulated CLL cells ( $N = 6$ ). Protein loading was assessed using an anti-GAPDH antibody (left). A box-and-whisker plot with data points ( $N = 6$ ) of densitometry analysis of the Western blot staining for p-BTK and NOTCH1-ICD that were calculated relative to total BTK and GAPDH, respectively (right). **B**, Representative Western blot analysis of NOTCH1-ICD [NOTCH1 (Val1744)] performed in nuclear (Nu) and cytoplasmic (Cy) extracts from CLL cells after IgM/IgG stimulation for 15 minutes. Adequate fractionation and protein loading were assessed using anti-lamin B1 and anti-β-tubulin antibodies. Data shown are representative of six patients examined. **C**, The box-and-whisker plot with data points shows analysis of *HES1*, *c-MYC*, and *DTX1* gene expression in CLL cells after IgM/IgG stimulation for 6 hours ( $N = 8$ ). mRNA levels were normalized to GAPDH and represented as fold change using unstimulated cells as a reference. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$  (stimulus vs. vehicle) according to Wilcoxon paired test.

phosphorylated-eIF4E ( $P < 0.01$ ) but not of its expression and transcriptional activity of NOTCH1/2 and the expression compared with untreated cells. These data reveal that ibrutinib displays an anti-NOTCH effect in CLL that impacts the levels of JAGGED1, implying a potential interplay between the BCR and NOTCH pathways.

Del Papa et al.



**Figure 4.** Colocalization and physical interactions of BTK and NOTCH1-ICD in CLL cells. **A**, Representative confocal images showing cytoplasmic colocalization of BTK and NOTCH1-ICD. CLL cells were stained with mouse anti-BTK (red) and rabbit anti-NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] (green) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). Merged panel depicts the merge three-color confocal image showing colocalization of BTK and NOTCH1-ICD in DAPI-stained cells. Images were acquired on a confocal microscope LSM 800 (Zeiss) with Airyscan using a 63× oil immersion and 1.4 NA objective (scale bar, 10 μm). Data shown are representative of three patients. **B**, Representative images of *in situ* PLA showing the interaction between BTK and NOTCH1-ICD under basal conditions. *In situ* PLA was performed using mouse anti-BTK and rabbit anti-NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] antibodies (see Materials and Methods section for details). Nuclei were stained with DAPI. Red spots indicate PLA-positive cells. Images were acquired using confocal microscopy using a 63× oil immersion and 1.4 NA objective (scale bar, 10 μm). **C–D**, Ibrutinib treatment for 24 hours induces a significant decrease of PLA-positive cells, indicating that BTK inhibition leads to destabilization of BTK/NOTCH1-ICD complexes. Box-and-whisker plot showing quantitative analysis of the PLA signals of 10 fields per sample. \*\*,  $P < 0.01$  according to Wilcoxon paired test. **E**, Representative blots of total BTK protein in CLL cells treated for 24 hours with ibrutinib (10 μmol/L) compared with untreated controls ( $N = 3$ ).

**BCR stimulation increases NOTCH1 signaling pathway in CLL cells *in vitro***

To further investigate the cross-talk between BCR and NOTCH1 signaling, we determined whether BCR engagement influenced NOTCH1 activation. We incubated CLL cells from IGHV-unmutated samples for 15 minutes with soluble anti-IgM/IgG antibodies known to activate the BCR ( $N = 6$ ). Results showed that BCR stimulation induced BTK phosphorylation ( $P < 0.05$ ), indicating an effective responsiveness of CLL cells (Fig. 3A). Strikingly, the levels of NOTCH1-ICD were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ) in BCR-stimulated cells compared with unstimulated controls (Fig. 3A).

To determine whether this induction of NOTCH1 increased its transcriptional activity, we examined NOTCH1-ICD nuclear translocation ( $N = 6$ ) and mRNA expression ( $N = 8$ ) of the NOTCH1

target genes *HES1*, *c-MYC*, and *DTX1* (31). Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic fractions of unstimulated CLL showed that NOTCH1-ICD was almost completely localized in nuclear extracts (Fig. 3B), consistent with constitutive NOTCH1 activation. After BCR stimulation, the NOTCH1-ICD nuclear levels (Fig. 3B), as well as *HES1*, *c-MYC*, and *DTX1* expression (Fig. 3C) increased 2.15 ± 0.96-fold, 2.13 ± 0.86-fold, and 2.56 ± 1.3-fold, respectively, compared with unstimulated controls ( $P < 0.01$ ).

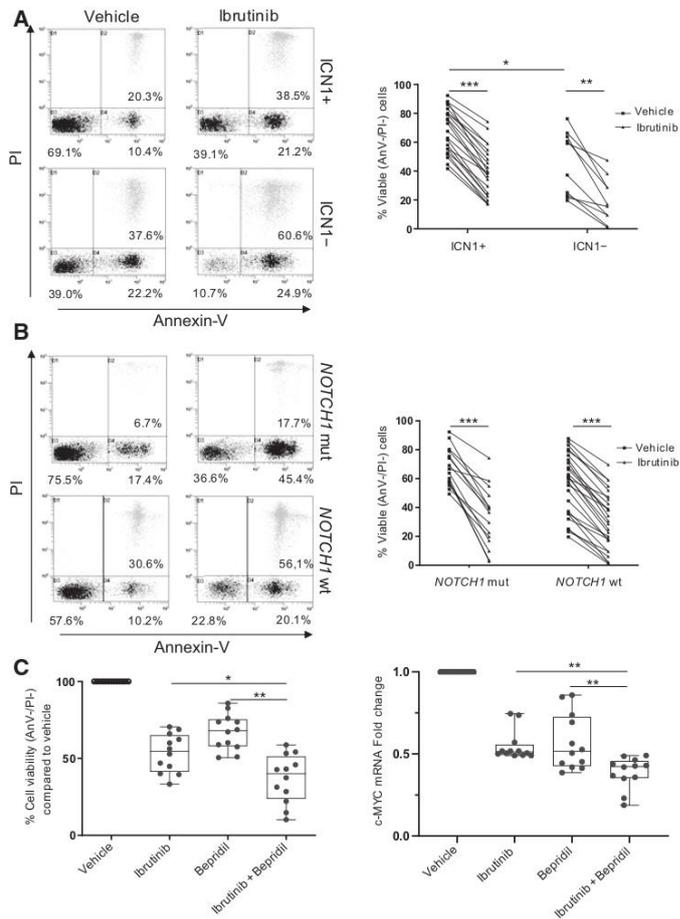
These data support the hypothesis of BTK as one of the potential kinases regulating NOTCH1 activation in CLL.

**BTK associates with NOTCH1-ICD in primary CLL cells**

We investigated the possibility that BTK interacts with the NOTCH1-ICD protein in primary CLL cells from ICN+ patients. First, we performed immunofluorescence using confocal

**Figure 5.**

The cytotoxic effects of ibrutinib depend on NOTCH1 and increase the anti-NOTCH1 activity of bepridil *in vitro*. **A**, Representative dot plots (left) and dot and line diagram (right) of Annexin V-FITC/PI staining results of viability in ibrutinib-treated CLL cells exhibiting or lacking the activated intracellular form of NOTCH1, indicated as ICN1+ ( $N = 22$ ) and ICN- ( $N = 10$ ), respectively. CLL cells were cultured in the presence of ibrutinib 10  $\mu\text{mol/L}$  or vehicle (DMSO) for 24 hours before Annexin V-FITC/PI staining. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$  according to Mann-Whitney for unpaired data and Wilcoxon for paired test. **B**, Representative dot plots (left) and dot and line diagram (right) of Annexin V-FITC/PI staining results of viability in ibrutinib-treated CLL cells with a mutated (*NOTCH1* mut;  $N = 15$ ) or wild-type (*NOTCH1* wt;  $N = 26$ ) *NOTCH1* gene. \*\*\*,  $P < 0.001$  according to Wilcoxon for paired test. **C**, Left, a box-and-whisker plot with data points of Annexin V-FITC/PI staining results of viability of ICN1+ CLL cells after 24-hour treatment with the combination of ibrutinib 10  $\mu\text{mol/L}$  and bepridil 2.5  $\mu\text{mol/L}$  compared to single treatment ( $N = 12$ ). Right, a box-and-whisker plot with data points of the analysis of c-MYC mRNA in ICN1+ CLL cells after 6-hour treatment with the combination of ibrutinib and bepridil ( $N = 12$ ). mRNA levels were normalized to GAPDH and represented as fold change using vehicle-treated cells as a reference. One-way ANOVA with Tukey *post hoc* test were performed to test for significant differences between multiple groups (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).



microscopy to define whether these two proteins reside at the same physical location in CLL cells ( $N = 3$ ). Our data demonstrated overlapping distribution of total BTK and NOTCH1-ICD proteins in the cytoplasm of leukemic cells (Fig. 4A). Furthermore, we investigated the BTK/NOTCH1-ICD interaction using *in situ* PLA ( $N = 3$ ), a highly sensitive technology extending the capabilities of traditional immunoassay to detect molecular interactions. Under basal conditions, CLL cells showed the presence of several red spots representing single protein-protein interaction with a cytoplasmic localization (Fig. 4B). *In vitro* treatment with 10  $\mu\text{mol/L}$  ibrutinib for 24 hours resulted in significant decrease in the percentage of CLL cells showing red spots (Fig. 4C and D). Nevertheless, Western blot analysis indicated that BTK total

protein was not degraded ( $N = 3$ ; Fig. 4E). Altogether, these data indicated that ibrutinib leads to destabilization of BTK/NOTCH1-ICD complexes in CLL without affecting BTK expression.

**Ibrutinib-induced CLL cytotoxicity *in vitro* is influenced by NOTCH1 activation status, but is independent of NOTCH1 mutation**

To determine the functional relevance of the anti-NOTCH activity of ibrutinib, we analyzed its cytotoxic effects on CLL in the context of NOTCH1 activation and mutation. First, we compared ICN1+ CLL ( $N = 22$ ) to cells lacking NOTCH1-ICD ( $N = 10$ ), referred to as ICN1 negative (ICN1-). In untreated cells, ICN1+ cell viability was higher than ICN1- ( $P < 0.05$ ).

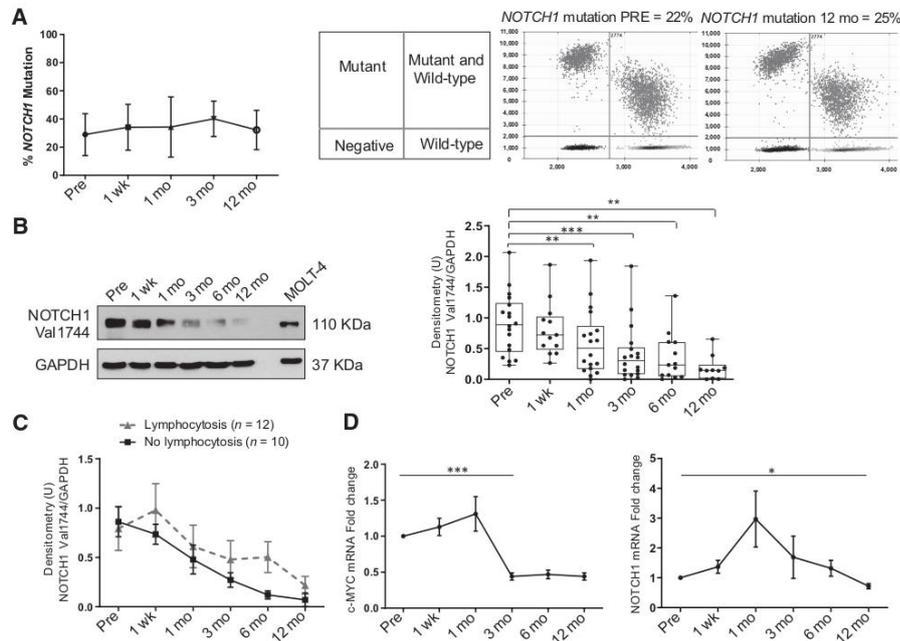
Del Papa et al.

Ibrutinib 10 μmol/L treatment significantly reduced viability and increased apoptosis of both ICN1+ ( $P < 0.001$ ) and ICN1- ( $P < 0.01$ ) CLL compared with controls (Fig. 5A). Remarkably, the percentage of reduction in cell viability induced by ibrutinib and normalized to the respective vehicle control, was higher in ICN1- than in ICN1+ cells ( $61.6\% \pm 22.3\%$  vs.  $44.5\% \pm 14.5\%$ ;  $P < 0.05$ ; Supplementary Fig. S4A), indicating that the lack of NOTCH1 activation renders cells more sensitive to the apoptotic effect of the drug. These data suggest that anti-NOTCH1 activity of ibrutinib represents an additional effect on cell death induction and lead us to hypothesize that NOTCH1 activation confers an increased CLL cell fitness against the antileukemic effects of BTKi.

It has been shown that NOTCH1-mutated CLL are associated with higher NOTCH1 activation and drug resistance compared

with NOTCH1 wild-type CLL (18). We measured the impact of NOTCH1 mutations on the cytotoxic effects of ibrutinib 10 μmol/L. As previously shown, spontaneous apoptosis is higher in NOTCH1 wild-type compared with mutated (18, 19). Compared with vehicle, ibrutinib reduced cell viability and increased apoptosis to a similar extent in either NOTCH1-mutated ( $N = 15$ ) or wild-type ( $N = 26$ ) CLL (Fig. 5B; Supplementary Fig. S4B), suggesting that the cytotoxic effect depended on NOTCH1 activity regardless its genetic alteration. In keeping with this observation, no differences emerged even when comparing CLL with high versus low NOTCH1 mutational burden (Supplementary Fig. S5).

In line with previous reports, ibrutinib 1 μmol/L was associated with a moderate reduction of CLL cell viability that was still significant in the context of samples with activated (ICN+;  $N =$



**Figure 6.** Ibrutinib downregulates NOTCH1 activity in serial samples from CLL-treated patients. **A**, Kinetics of the NOTCH1-mutated clone in three patients with CLL longitudinally investigated by ddPCR during ibrutinib treatment. A schematic representation of positive and negative droplet distribution according to the fluorophore threshold indicated in lines and representative scatterplots depicting ddPCR results specifically for the NOTCH1 mutation assay in one sample before (PRE) and 12 months (mo) after ibrutinib treatment. **B**, Representative Western blot analysis of the activated NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] protein levels in serial samples of a ibrutinib-treated CLL patient within a 12-month period (left). The box-and-whisker plot with data points on the right represent a quantitative densitometry analysis of the Western blot staining for NOTCH1(Val1744) in the cohort of 18 ibrutinib-treated patients overtime. Densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH. **C**, Kinetics of activated NOTCH1-ICD [NOTCH1(Val1744)] expression in ICN1+ CLL cases split according to ibrutinib-related lymphocytosis, shown as mean values. The number of patients included in each group are reported in parentheses; the error bars indicate SEM. **D**, Time course of NOTCH1 and c-MYC mRNA expression in CLL cells collected in 25 ibrutinib-treated patients at the indicated timepoints. mRNA levels were normalized to GAPDH and represented as fold change using the baseline (Pre) as a reference. Results are the mean  $\pm$  SEM. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; and \*,  $P < 0.05$  according to Wilcoxon paired test.

10;  $P < 0.01$ ), unactivated (ICN $-$ ;  $N = 8$ ;  $P < 0.01$ ; Supplementary Fig. S6A), mutated ( $N = 7$ ;  $P < 0.05$ ), and wild-type *NOTCH1* ( $N = 11$ ;  $P < 0.01$ ; Supplementary Fig. S6B).

**The combination of ibrutinib with the anti-NOTCH1 small-molecule bepridil enhances CLL cell death *in vitro***

The data above indicate the need for combination therapy that may be more effective against the NOTCH1 signaling to overcome the reduced efficacy of ibrutinib toward ICN1+ CLL. Recently, we identified bepridil (32) as an alternative approach to the  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI)-based NOTCH1 inhibition and a promising candidate for CLL target therapy. We used ibrutinib 10  $\mu\text{mol/L}$  in combination with bepridil to analyze their cytotoxic effects on ICN1+ CLL *in vitro* ( $N = 12$ ). After 24-hour treatment, flow cytometry showed a significant reduction of cell viability and a strong apoptotic induction by drug combination compared with single treatment normalized with vehicle control ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ; Fig. 5C, left). The antileukemic effect of ibrutinib and bepridil combination also correlated with a significant downregulation of the NOTCH1 target *c-MYC* measured after 6-hour treatment ( $N = 12$ ;  $P < 0.01$ ; Fig. 5C, right). Significant effects on cell viability ( $N = 14$ ;  $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ) and *c-MYC* mRNA expression ( $N = 14$ ;  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ) were also observed when we compared the combination of ibrutinib 1  $\mu\text{mol/L}$  and bepridil (Supplementary Fig. S6C). Altogether, these data indicate that the NOTCH1 inhibitor bepridil enhances the antileukemic activity of ibrutinib and its ability to downregulate the NOTCH1 target *c-MYC*, even if these effects do not seem to be synergistic.

**NOTCH1 mutation has no impact on the outcome of ibrutinib-treated CLL patients in a real-life monocentric experience**

The increasing number of patients under ibrutinib treatment allows the acquisition of extremely relevant real-life data at the clinical and biological levels. Here, we analyzed the efficacy of ibrutinib in a cohort of 33 patients in treatment at our institution. Baseline characteristics are shown in Supplementary Table S4. Median age was 71 years. Patients had a more advanced disease in terms of Rai or Binet stages (69% stage III–IV and 97% stage B–C, respectively). Twenty-seven percent had lymph nodes  $\geq 5$  cm. Ninety-four percent were R/R CLL with a median of two prior therapies (range, 0–6; 6% of previously untreated). Del(17p) and/or *TP53* mutation tests were performed in 29 patients and 27% were positive. *NOTCH1* mutation was present in 39% of patients analyzed with six patients harboring small subclones and significantly correlated with unmutated IGHV (77%;  $P < 0.01$ ). Cooccurrence of mutated *NOTCH1* and del(11q) or *TP53* alterations was uncommon.

The best overall response varies between *NOTCH1*-mutated versus wild-type CLL (54% vs. 68.4%, respectively) due to a lower complete remission rate and higher percentage of stable disease in mutated patients (15.5% vs. 31.6% and 46% vs. 26.3%, respectively). Median follow-up on ibrutinib was 21 months with an estimated PFS and OS of 85.5% and 78.9%, respectively (Supplementary Fig. S7). Although *NOTCH1*-mutated patients showed reduced PFS and OS compared with wild-type CLL, curve comparison did not show statistically significant differences between these groups (Supplementary Fig. S7). These data are consistent with *in vitro* evidence demonstrating that ibrutinib efficacy is independent of *NOTCH1* mutational status.

A statistical comparison of ibrutinib efficacy between patients with ICN1+ versus ICN1- CLL was not feasible, due to the extremely limited number of ICN1- samples. Indeed, the majority of patients (around 90%) displayed an active form of NOTCH1 compared with 50% described in previous analysis of Fabbri and colleagues (22). The higher incidence of ICN1+ CLL in our cohort may be related to the presence of mainly R/R CLL, suggesting a potential correlation between NOTCH1 activation and a resistant phenotype. As the median duration of response to ibrutinib in CLL prospective cohort studies inversely correlated with the number of prior therapy lines, our data further support the results of clinical trials on the use of ibrutinib as first-line therapy, when the incidence of ICN+ CLL is expected to be low.

**NOTCH1 activity is downregulated in patients with CLL under ibrutinib treatment**

We next investigated whether and how ibrutinib affected NOTCH1 activation during the course of therapy, analyzing serial purified CLL cells samples collected from patients at baseline and after different times from the initiation of therapy.

First, we examined whether the clonal frequency of the *NOTCH1*-mutated gene changed during the course of treatment. A ddPCR analysis of the *NOTCH1* mutation burden did not reveal any significant alteration from baseline during 1-year follow-up (Fig. 6A), indicating that ibrutinib has no impact on the clonal selection of *NOTCH1* mutations.

Then, we measured by Western blotting the status of the NOTCH1 activity on purified CLL cells from ibrutinib-treated patients. As shown in Fig. 6B, there was a progressive reduction of NOTCH1-ICD expression during the course of therapy. Specifically, the levels of cleaved NOTCH1 were significantly decreased starting at month 1 compared with baseline and reached approximately 5 $\times$  reduction after 1-year treatment ( $N = 18$ ;  $P < 0.01$ ). The presence of a *NOTCH1* mutation delayed the clearance of NOTCH1-ICD that was significantly reduced from baseline after 6-month treatment ( $N = 6$ ;  $P < 0.05$ ; Supplementary Fig. S8). Notably, NOTCH1 activity resulted similarly low in both *NOTCH1*-mutated and unmutated samples at 1-year follow-up.

Ibrutinib treatment typically leads to the emergence of lymphocytosis that can persist for a long time even in the presence of a clinical benefit. In our patients, the reduction of NOTCH1-ICD levels by ibrutinib was more rapid and profound in patients with a lower number of lymphocytes in the PB (Fig. 6C).

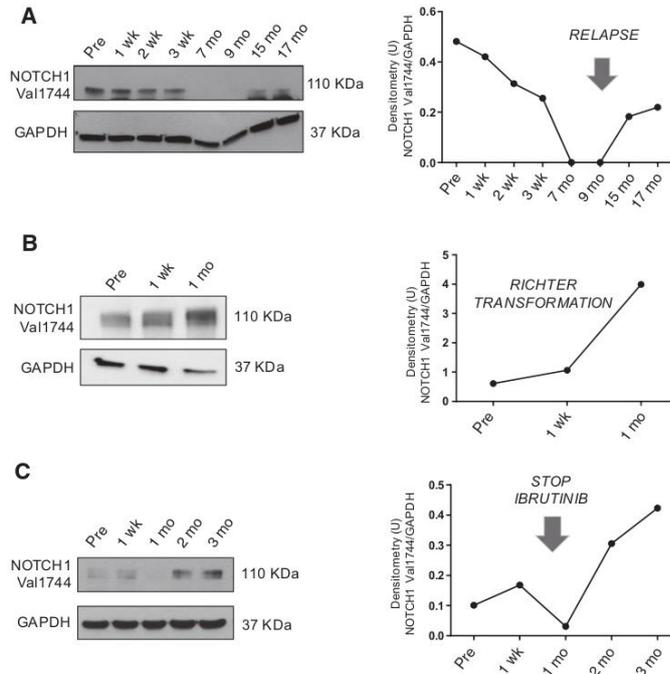
Activation of NOTCH1 target genes represents a reliable readout of NOTCH1 activity. A recent study identified *c-MYC* as a NOTCH1-transactivated gene (22). To further define the impact of ibrutinib on NOTCH1 activity, we measured mRNA expression of *c-MYC* in serial CLL samples. Our data demonstrated that this NOTCH1 target was significantly downregulated after 3 months of ibrutinib treatment ( $N = 25$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 6D). Conversely, a transcriptional downregulation of the *NOTCH1* gene occurred at later time points, with a significant mRNA reduction observed after 1-year treatment ( $N = 25$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 6D).

In keeping with *in vitro* data, these results suggest that the *in vivo* NOTCH1 activity was significantly reduced by the BTKi during treatment.

**NOTCH1 activation is a marker of resistance, disease evolution, and treatment adherence in patients under ibrutinib therapy**

Mechanisms of resistance to ibrutinib so far identified are the result of mutations in *BTK* or *PLCG2* genes. To date, these

Del Papa et al.



**Figure 7.**

The levels of activated NOTCH1 protein correlated with the clinical response to ibrutinib. Kinetics of activated NOTCH1-ICD expression in the setting of ibrutinib-treated CLL at relapse (A), in a patient with Richter syndrome (B), and in a case of drug discontinuation for intolerance (C). Western blotting staining was performed using the NOTCH1 (Val1744) antibody (left) and densitometry units (U) were calculated relative to GAPDH (right).

mutations precede clinical relapses in most of the cases, but the existence of other concomitant or alternative biological escape mechanisms of CLL cells treated with ibrutinib remains unclear.

**Patients 1–2.** To explore the role of NOTCH1 as a new molecular mechanism of drug resistance, we analyzed serial samples from two patients treated with ibrutinib who developed CLL progression during the course of therapy. Ibrutinib treatment of the first patient determined blood count normalization and a significant reduction of lymph node dimensions in 1 year. However, after 15-month treatment, we observed CLL progression. Sanger sequencing analysis excluded *BTK* mutations, but showed a new variant of the *PLCG2* gene (Supplementary Fig. S9). This mutation consisted in a K722R point mutation that affected the SH2 loci of the auto-inhibitory domain, the same region of the R665W mutations previously described in ibrutinib-resistant patients. We hypothesized that the newly identified K722R variant might have similar capability.

Notably, the levels of activated NOTCH1-ICD protein in cells collected during treatment directly correlated with disease activity (Fig. 7A). Upon ibrutinib treatment, NOTCH1-ICD levels decreased gradually and consistently over time and became undetectable after 7 months. Strikingly, ibrutinib-resistant CLL cells showed again a cleaved NOTCH1 band. We documented a similar clinical and NOTCH1-ICD expression trend in a second

patient lacking *BTK/PLCG2* mutations while relapsing under ibrutinib (Supplementary Fig. S10).

These data indicated that NOTCH1 deregulation was concomitant or alternative to *BTK/PLCG2* mutations in patients with CLL relapsing under ibrutinib treatment.

**Patient 3.** Despite ibrutinib's activity in CLL, treatment has to be prematurely stopped in cases of Richter transformation (RT; refs. 33, 34). We explored the role of NOTCH1 signaling in such setting, as reasons for treatment failure are still under investigation. We report a case of a patient starting ibrutinib for progressive CLL with nasopharyngeal invasion and cervical lymphadenopathy, together with del(17p). After 1 month of therapy, neck lymph node size was higher than baseline with histologic documentation of RT. The levels of activated NOTCH1-ICD in PB CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> cells paralleled disease transformation (Fig. 7B).

**Patient 4.** Many patients treated with ibrutinib develop adverse events, representing drug-limiting toxicity with impact on clinical outcomes. We measured NOTCH1 activity in serial samples from a patient that discontinued ibrutinib for gastrointestinal toxicity. As shown in Fig. 7C, the levels of the cleaved NOTCH1 band became barely detectable during ibrutinib treatment and increased again after drug withdrawal. These data provide further support for a link between the

antileukemic activity of ibrutinib and its capacity to modulate the NOTCH1 signaling.

## Discussion

BCR signaling plays an integral role in B-cell malignancies' development, representing a ripe target for innovative therapy in CLL. Thus, the identification of molecular mechanisms underlying BCR inhibition and novel interaction partners of the BCR has the potential to further improve CLL-targeted treatments. In this study, we provided new evidence of a relationship between the BCR pathway and NOTCH1 activity. *In vitro*, the BTK inhibitor ibrutinib impaired NOTCH1 activity while BCR stimulation increased NOTCH1-ICD levels, suggesting that BTK might be one of the regulators of NOTCH1 signaling activation in CLL.

The interaction between NOTCH and BCR has been previously described in murine primary B cells (35), in which NOTCH1 appeared as an important mediator of BCR-induced enhancement of B-cell activation. In this context, BCR stimulation increased NOTCH1 mRNA and protein expression, but not signaling activation, for which it was necessary the interaction of activated B cells with a NOTCH ligand. Conversely, our findings showed that in CLL, BCR stimulation alone was able to enhance NOTCH1 activation as evidenced by the increased nuclear levels of NOTCH1-ICD and NOTCH1 transcriptional signature. Interestingly, these data support the hypothesis of an intrinsic ligand-independent mechanism of NOTCH activation in CLL that could synergize with the BCR signaling for leukemia progression. In this respect, Thomas and colleagues (36) demonstrated that the proliferation of B cells depends on NOTCH, CD40, and BCR activity *in vitro*. Moreover, data from lymphoma cell lines suggest that NOTCH signaling might interact with BCR signaling at the level of their common downstream gene *c-MYC* to regulate cell proliferation and apoptosis (37). In agreement with the above observation, even in CLL cells, both BCR and NOTCH signaling lead to MYC activation for the leukemic clone expansion (38).

In this work, we provided new evidence for BTK off-target effects that involve downregulation not only of NOTCH1 but also of NOTCH2 activity and JAGGED1 expression. In many tumor subtypes, ibrutinib appears to work via several intracellular signals of cancer growth demonstrating that this drug is not entirely specific in its binding to BTK (39, 40). Ibrutinib efficacy was associated to a direct anti-EGFR effect in lung cancer (41) or to the activity against EGFR-induced NF- $\kappa$ B activation in glioma (42). In addition, ibrutinib reduced phosphorylated HER2 and AKT in breast cancer (43), while sensitivity to inhibition of BTK has been demonstrated in MYC-amplified esophageal tumor lines (44). Interestingly, aberrant NOTCH signaling activation has been implicated in many of the abovementioned solid tumors (45). Therefore, our finding of the anti-NOTCH effects of ibrutinib might open new potential avenues for expanding the clinical utility of BTK inhibitors by repurposing this drug to other NOTCH-related tumors, beside CLL.

Mechanistically, the evidence that specific silencing of BTK decreased the levels of NOTCH1-ICD in CLL cells suggested that the anti-NOTCH1 effect of ibrutinib partially depends on the inhibition of BTK activity. Moreover, results of *in situ* PLA experiments showed the presence in CLL cells of NOTCH1-ICD/BTK complexes, whose number was reduced after ibrutinib treatment. On this basis, we suggest that active BTK interacts with NOTCH1-

ICD to maintain its levels, and that ibrutinib leads to NOTCH1-ICD downregulation by causing weakening of NOTCH1-ICD/BTK interactions.

We showed that when ibrutinib was used in patients with CLL, it exhibited a strong clinical activity associated with downregulation of NOTCH1 signaling. This latter effect began to be significant 1 month after the initiation of ibrutinib in patients with CLL, suggesting that pathways other than BTK, may maintain NOTCH1 signaling or contrast NOTCH1 downregulation induced by ibrutinib in early phase of treatment.

Our results showed that NOTCH1 signaling was restored at relapse and remained activated in RT. These data suggest that NOTCH1 activation contribute to counteract the antileukemic activity of ibrutinib, representing a new potential mechanism of drug resistance. In keeping with this hypothesis, we demonstrated that ibrutinib exerted *in vitro* increased cytotoxicity in CLL cells with inactive NOTCH1 compared with CLL-expressing NOTCH1-ICD. An additional clinical implication of our findings is that ibrutinib-treated patients may benefit of combinatorial drug therapy to target multiple pathways that are linked to the BCR signaling, including the NOTCH pathway. In this context, Secchiero and colleagues (46) recently described the potential antileukemic activity of the combination of ibrutinib with GSIs in primary CLL cells *in vitro*. The use of GSIs in clinical trials showed on-target toxicities that have been, in part, overcome by altering the schedule of delivery and attenuated by the use of steroids (47, 48). Thus, the identification of more selective NOTCH1 antagonists represents an alternative method to target NOTCH1 in CLL avoiding the risk of GSIs toxicity (7, 49). We recently demonstrated that bepridil is an anti-NOTCH1 molecule with antileukemic effects in preclinical models of CLL (32). Here, we demonstrated that bepridil enhanced the cytotoxic effect of ibrutinib against primary CLL cells, underlying the high potential of NOTCH-targeted therapies in overcoming CLL drug resistance. Because the effects of ibrutinib-bepridil combination do not appear to be synergistic, the individual components of BTK and NOTCH1 inhibitor combination should be carefully selected in future translational research in CLL. Moreover, to identify the patients who could benefit from these combined therapies, it would be relevant to characterize the interactions between BCR and NOTCH1 pathways in CLL subsets carrying distinct stereotyped BCR, in particular, in CLL of the stereotyped subset 8 that are characterized by a high frequency of NOTCH1 mutations and a robust BCR signaling (50).

Our *in vitro* data showed that the cytotoxic efficacy of ibrutinib is similar in NOTCH1-mutated and unmutated patients. Consequently, the presence of NOTCH1 mutations did not negatively impact the efficacy of ibrutinib on the outcome of our CLL cohort, in line with the results of prospective studies using ibrutinib in CLL. In the RESONATE trial of patients with previously treated CLL (51), the 18-month PFS with ibrutinib was similar regardless of baseline genetic NOTCH1 status. Overall response and PFS were not influenced by the presence of NOTCH1 mutations in a subgroup analysis of the RESONATE-17 that included only del (17p) patients (52). Evolutionary dynamics induced by targeted therapy in CLL have been analyzed by whole-exome sequencing of samples during ibrutinib therapy (53). Over the first year of treatment, BTK-targeted therapy is associated with overall clonal stability in more than half of CLLs. We described that the NOTCH1 mutational burden in the leukemia clone did not significantly change over the first-year treatment. The general

Del Papa et al.

stability of *NOTCH1*-mutated clones is consistent with prior studies reporting comparable response rates to ibrutinib for both *NOTCH1*-mutated and wild-type CLL (51).

Relapse of CLL after ibrutinib is an issue of clinical significance. On the basis of published data, the cumulative incidence of discontinuation for progression is variable between patient populations ranging from 19% in the R/R (54) to 43% in high-risk CLL (5). Mutations in *BTK* and *PLCγ2* have emerged as main mechanisms of drug resistance (55). Specifically, the mutation of a cysteine residue of BTK reduced the ibrutinib-binding affinity while *PLCγ2* mutations promoted BTK-independent BCR activation (6).

However, not all patients carry these mutations (55), and there are alternative mechanisms that bypass BTK in other ibrutinib-resistant lymphoproliferative disorders (56). Our data point to the assessment of *NOTCH1*-ICD levels as a new marker of disease response and indicate *NOTCH1* activation as an alternative mechanism underlying acquired resistance, independent of *BTK/PLCG2* mutations. It could therefore be advantageous to monitor *NOTCH1* activation status in CLL under ibrutinib treatment to track the evolution of the malignant clone for the optimization of follow-up timing and eventually inform further treatment choices.

In conclusion, we demonstrated that the therapeutic response to ibrutinib is associated with the decrease of *NOTCH1* activation, an important pathway for CLL pathogenesis. Activated *NOTCH1* represents a new mechanism of resistance and a marker to monitor disease response in CLL. All these findings not only provide further support to ibrutinib therapy optimization, but also for its exploration in combination with anti-*NOTCH1* agents in the setting of primary or acquired resistance.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### References

- Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016;16:145–62.
- Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2013;34:592–601.
- Woyach JA, Johnson AJ, Byrd JC. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood* 2012;120:1175–84.
- Herman SE, Gordon AL, Hertlein E, Ramanunni A, Zhang X, Jaglowski S, et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood* 2011;117:6287–96.
- Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013;369:32–42.
- Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapata M, Ruppert AS, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014;370:2286–94.
- Rosati E, Baldoni S, De Falco F, Del Papa B, Dorillo E, Rompietti C, et al. *NOTCH1* aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Front Oncol* 2018; 8:229.
- Arruga F, Gizdic B, Bologna C, Cignetto S, Buonincontri R, Serra S, et al. Mutations in *NOTCH1* PEST domain orchestrate CCL19-driven homing of chronic lymphocytic leukemia cells by modulating the tumor suppressor gene *DUSP22*. *Leukemia* 2017;31:1882–93.
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood* 2009;113: 856–65.
- Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, Martelli ME, et al. A new genetic lesion in B-CLL: a *NOTCH1* PEST domain mutation. *Br J Haematol* 2009;146:689–91.
- Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. *NOTCH1* PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 2010;151:404–6.
- Sportoletti P, Baldoni S, Del Papa B, Cantaffa R, Ciurnelli R, Aureli P, et al. A novel *NOTCH1* PEST domain mutation in a case of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:1780–2.
- Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khabanian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of *NOTCH1* mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389–401.
- Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of *NOTCH1* are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521–9.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101–5.
- Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. *SF3B1* and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:2497–506.
- Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;526:525–30.
- Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M, et al. Functional impact of *NOTCH1* mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014;28:1060–70.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** B. Del Papa, S. Baldoni, P. Sportoletti  
**Development of methodology:** B. Del Papa, S. Baldoni, E. Dorillo, F. De Falco, C. Rompietti, D. Cecchini, M.G. Cantelmi, D. Sorcini, M. Nogarotto, F.M. Adamo, F. Mezzasoma, E.C.S. Barcelos, R.I. Ostini, A.D. Tommaso, A. Marra, G. Montanaro, E. Rosati, P. Sportoletti  
**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** E. Albi, R.I. Ostini, F. Falzetti, P. Sportoletti  
**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** B. Del Papa, S. Baldoni, E. Dorillo, F. De Falco, C. Rompietti, D. Cecchini, M.G. Cantelmi, D. Sorcini, M. Nogarotto, F.M. Adamo, F. Mezzasoma, E.C.S. Barcelos, R.I. Ostini, A.D. Tommaso, A. Marra, M.P. Martelli, F. Falzetti, M.D. Ianni, E. Rosati, P. Sportoletti  
**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** B. Del Papa, S. Baldoni, E. Dorillo, F. De Falco, C. Rompietti, D. Cecchini, M.G. Cantelmi, D. Sorcini, M. Nogarotto, F.M. Adamo, F. Mezzasoma, E.C.S. Barcelos, E. Albi, R.I. Ostini, A.D. Tommaso, A. Marra, M.P. Martelli, F. Falzetti, M.D. Ianni, E. Rosati, P. Sportoletti  
**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** B. Del Papa, S. Baldoni, F. De Falco, C. Rompietti, M. Nogarotto, F.M. Adamo, E.C.S. Barcelos, E. Albi, F. Falzetti, P. Sportoletti  
**Study supervision:** P. Sportoletti

#### Acknowledgments

The authors thank Tiziana Zei, Lorenzo Moretti and Giulia Formichetti for their technical support on molecular diagnostics and cellular selection. This work was supported by AIRC MFAG 2015 - ID.17442 Project - and IG 2018 - ID. 21352 Project - (principal investigator: P. Sportoletti) and from the Italian Ministry of Education, University and Research - Programma SIR N. RBS14GPBL (to P. Sportoletti), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 19/2016 (E.C.S. Barcelos).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 5, 2019; revised August 2, 2019; accepted September 24, 2019; published first October 2, 2019.

19. De Falco F, Sabatini R, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P, Baldoni S, et al. Constitutive phosphorylation of the active Notch1 intracellular domain in chronic lymphocytic leukemia cells with NOTCH1 mutation. *Leukemia* 2015;29:994–8.
20. Villamor N, Conde L, Martinez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Bea S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100–6.
21. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, Villamor N, Gutierrez-Abril J, Martin-Subero JL, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015;526:519–24.
22. Fabbri G, Holmes AB, Viganotti M, Scuoppo C, Belver L, Herranz D, et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E2911–E9.
23. Di Ianni M, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, De Falco F, et al. NOTCH1 is aberrantly activated in chronic lymphocytic leukemia hematopoietic stem cells. *Front Oncol* 2018;8:105.
24. Yeomans A, Thirdborough SM, Valle-Argos B, Linley A, Krysov S, Hidalgo MS, et al. Engagement of the B-cell receptor of chronic lymphocytic leukemia cells drives global and MYC-specific mRNA translation. *Blood* 2016;127:449–57.
25. Sportoletti P, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, Ruggeri L, et al. A revised NOTCH1 mutation frequency still impacts survival while the allele burden predicts early progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2014;28:436–9.
26. Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Garcia-Manero G, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. *Blood* 2012;119:569–72.
27. Malcikova J, Tausch E, Rossi D, Sutton LA, Soussi T, Zenz T, et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 2018;32:1070–80.
28. Chia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1–3.
29. De Falco F, Del Papa B, Baldoni S, Sabatini R, Falzetti F, Di Ianni M, et al. IL-4-dependent Jagged1 expression/processing is associated with survival of chronic lymphocytic leukemia cells but not with Notch activation. *Cell Death Dis* 2018;9:1160.
30. De Falco F, Sabatini R, Del Papa B, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P, et al. Notch signaling sustains the expression of Mcl-1 and the activity of eIF4E to promote cell survival in CLL. *Oncotarget* 2015;6:16559–72.
31. Pozzo F, Bittolo T, Vendramini E, Bomben R, Bulian P, Rossi FM, et al. NOTCH1-mutated chronic lymphocytic leukemia cells are characterized by a MYC-related overexpression of nucleophosmin 1 and ribosome-associated components. *Leukemia* 2017;31:2407–15.
32. Baldoni S, Del Papa B, Dorillo E, Aureli P, De Falco F, Rompietti C, et al. Bepiridil exhibits anti-leukemic activity associated with NOTCH1 pathway inhibition in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 2018;143:958–70.
33. Jain P, Keating M, Wierda W, Estrov Z, Ferrajoli A, Jain N, et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood* 2015;125:2062–7.
34. Albi E, Baldoni S, Aureli P, Dorillo E, Del Papa B, Ascani S, et al. Ibrutinib treatment of a patient with relapsing chronic lymphocytic leukemia and sustained remission of Richter syndrome. *Tumori* 2017;103:e37–e40.
35. Kang JA, Kim WS, Park SG. Notch1 is an important mediator for enhancing of B-cell activation and antibody secretion by Notch ligand. *Immunology* 2014;143:550–9.
36. Thomas M, Calamito M, Srivastava B, Maillard I, Pear WS, Allman D. Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation. *Blood* 2007;109:3342–50.
37. He F, Wang L, Hu XB, Yin DD, Zhang P, Li GH, et al. Notch and BCR signaling synergistically promote the proliferation of Raji B-lymphoma cells. *Leuk Res* 2009;33:798–802.
38. Rossi D. MYC addiction in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:905–6.
39. Berglof A, Hamasy A, Meinke S, Palma M, Krstic A, Mansson R, et al. Targets for ibrutinib beyond B cell malignancies. *Scand J Immunol* 2015;82:208–17.
40. Tissino E, Benedetti D, Herman SEM, Ten Hacken E, Ahn IE, Chaffee KG, et al. Functional and clinical relevance of VLA-4 (CD49d/CD29) in ibrutinib-treated chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2018;215:681–97.
41. Gao W, Wang M, Wang L, Lu H, Wu S, Dai B, et al. Selective antitumor activity of ibrutinib in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju204.
42. Yue C, Niu M, Shan QQ, Zhou T, Tu Y, Xie P, et al. High expression of Bruton's tyrosine kinase (BTK) is required for EGF-induced NF- $\kappa$ B activation and predicts poor prognosis in human glioma. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:132.
43. Wang X, Wong J, Sevinsky CJ, Kokabee L, Khan F, Sun Y, et al. Bruton's tyrosine kinase inhibitors prevent therapeutic escape in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2016;15:2198–208.
44. Chong IV, Aronson I, Bryant H, Gulati A, Campbell J, Elliott R, et al. Mapping genetic vulnerabilities reveals BTK as a novel therapeutic target in oesophageal cancer. *Gut* 2018;67:1780–92.
45. Huang T, Zhou Y, Cheng AS, Yu J, To KF, Kang W. NOTCH receptors in gastric and other gastrointestinal cancers: oncogenes or tumor suppressors? *Mol Cancer* 2016;15:80.
46. Secchiero P, Voltan R, Rimondi E, Melloni E, Athanasakis E, Tisato V, et al. The  $\gamma$ -secretase inhibitors enhance the anti-leukemic activity of ibrutinib in B-CLL cells. *Oncotarget* 2017;8:59235–45.
47. Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, et al. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2012;30:2307–13.
48. Real PJ, Tosello V, Palomero T, Castillo M, Hernandez E, de Stanchina E, et al. Gamma-secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 2009;15:50–8.
49. Lopez-Guerra M, Xargay-Torrent S, Rosich L, Montarveta A, Roldan J, Matas-Céspedes A, et al. The  $\gamma$ -secretase inhibitor PF-03084014 combined with fludarabine antagonizes migration, invasion and angiogenesis in NOTCH1-mutated CLL cells. *Leukemia* 2015;29:96–106.
50. Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Brusca A, et al. Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:4902–5.
51. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre SE, et al. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia* 2018;32:83–91.
52. Boddu P, Ferrajoli A. Prognostic factors in the era of targeted therapies in CLL. *Curr Hematol Malig Rep* 2018;13:78–90.
53. Landau DA, Sun C, Rosebrock D, Herman SEM, Fein J, Sivina M, et al. The evolutionary landscape of chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib targeted therapy. *Nat Commun* 2017;8:2185.
54. Woyach JA, Ruppert AS, Guinn D, Lehman A, Blachly JS, Lozanski A, et al. BTK(C481S)-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2017;35:1437–43.
55. Lampon BL, Brown JR. Are BTK and PLCG2 mutations necessary and sufficient for ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia? *Expert Rev Hematol* 2018;11:185–94.
56. Zhang SQ, Smith SM, Zhang SY, Lynn Wang Y. Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2015;170:445–56.

# Clinical Cancer Research

## Decreased NOTCH1 Activation Correlates with Response to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia

Beatrice Del Papa, Stefano Baldoni, Erica Dorillo, et al.

*Clin Cancer Res* 2019;25:7540-7553. Published OnlineFirst October 2, 2019.

<b>Updated version</b>	Access the most recent version of this article at: <a href="https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1009">doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1009</a>
<b>Supplementary Material</b>	Access the most recent supplemental material at: <a href="http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2019/10/02/1078-0432.CCR-19-1009.DC1">http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2019/10/02/1078-0432.CCR-19-1009.DC1</a>
<b>Cited articles</b>	This article cites 56 articles, 15 of which you can access for free at: <a href="http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540.full#ref-list-1">http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540.full#ref-list-1</a>
<b>Citing articles</b>	This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles. Access the articles at: <a href="http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540.full#related-urls">http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540.full#related-urls</a>
<b>E-mail alerts</b>	<a href="#">Sign up to receive free email-alerts</a> related to this article or journal.
<b>Reprints and Subscriptions</b>	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:pubs@aacr.org">pubs@aacr.org</a> .
<b>Permissions</b>	To request permission to re-use all or part of this article, use this link <a href="http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540">http://clincancerres.aacrjournals.org/content/25/24/7540</a> . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.



## OPEN ACCESS

**Edited by:**

Dimitar G. Efremov,  
International Centre for Genetic  
Engineering and Biotechnology, Italy

**Reviewed by:**

Riccardo Bomben,  
Aviano Oncology Reference Center  
(IROCCS), Italy  
Ilaria Del Giudice,  
Sapienza University of Rome, Italy  
Maria Ilaria Del Principe,  
University of Rome Tor Vergata, Italy

**\*Correspondence:**

Paolo Sportoletti  
paolo.sportoletti@uniroma3.it

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

<sup>‡</sup>These authors have contributed  
equally to this work

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Hematologic Malignancies,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 16 February 2021

**Accepted:** 04 May 2021

**Published:** 26 May 2021

**Citation:**

Baldoni S, Del Papa B, De Falco F,  
Dorillo E, Sorrentino C, Rompietti C,  
Adamo FM, Nogarotto M, Cecchini D,  
Mondani E, Silva Barcelos EC,  
Moretti L, Marnelli MG, Fabi B,  
Sorcini D, Stella A, Giancola R,  
Guardalupi F, Ulbar F, Plebani S,  
Guarente V, Rosati E,  
Di Nicola M, Marchioni M,  
Di Ianni M and Sportoletti P (2021)  
NOTCH1 Activation Negatively  
Impacts on Chronic Lymphocytic  
Leukemia Outcome and Is Not  
Correlated to the NOTCH1 and  
IGHV Mutational Status.  
Front. Oncol. 11:668573.  
doi: 10.3389/fonc.2021.668573

# NOTCH1 Activation Negatively Impacts on Chronic Lymphocytic Leukemia Outcome and Is Not Correlated to the NOTCH1 and IGHV Mutational Status

Stefano Baldoni<sup>1,2†</sup>, Beatrice Del Papa<sup>1†</sup>, Filomena De Falco<sup>1</sup>, Erica Dorillo<sup>1</sup>,  
Carlo Sorrentino<sup>2</sup>, Chiara Rompietti<sup>1</sup>, Francesco Maria Adamo<sup>1</sup>, Manuel Nogarotto<sup>1</sup>,  
Debora Cecchini<sup>1</sup>, Elena Mondani<sup>1</sup>, Estevo Carlos Silva Barcelos<sup>1,3</sup>, Lorenzo Moretti<sup>1</sup>,  
Maria Grazia Marnelli<sup>1</sup>, Bianca Fabi<sup>2</sup>, Daniele Sorcini<sup>1</sup>, Arianna Stella<sup>1</sup>,  
Raffaella Giancola<sup>4</sup>, Francesco Guardalupi<sup>2</sup>, Francesca Ulbar<sup>2</sup>, Sara Plebani<sup>5</sup>,  
Valerio Guarente<sup>1</sup>, Emanuela Rosati<sup>6</sup>, Marta Di Nicola<sup>7</sup>, Michele Marchioni<sup>7</sup>,  
Mauro Di Ianni<sup>2,4‡</sup> and Paolo Sportoletti<sup>1\*‡</sup>

<sup>1</sup>Institute of Hematology-Centro di Ricerca Emato-Oncologica (CREO), Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Perugia, Italy, <sup>2</sup>Department of Medicine and Aging Sciences, "G. d'Annunzio" University of Chieti-Pescara, Chieti, Italy, <sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Postgraduate Program in Biotechnology (UFES), Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil, <sup>4</sup>Department of Oncology and Hematology, "Santo Spirito" Hospital, Pescara, Italy, <sup>5</sup>Hematology Unit, "San Salvatore" Hospital, L'Aquila, Italy, <sup>6</sup>Department of Medicine and Surgery, University of Perugia, Perugia, Italy, <sup>7</sup>Department of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, "G. d'Annunzio" University of Chieti-Pescara, Chieti, Italy

NOTCH1 mutations and deregulated signal have been commonly found in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients. Whereas the impact of NOTCH1 mutations on clinical course of CLL has been widely studied, the prognostic role of NOTCH1 activation in CLL remains to be defined. Here, we analyzed the activation of NOTCH1/NOTCH2 (ICN1/ICN2) and the expression of JAGGED1 (JAG1) in 163 CLL patients and evaluated their impact on TTFT (Time To First Treatment) and OS (Overall Survival). NOTCH1 activation (ICN1+) was found in 120/163 (73.6%) patients. Among them, 63 (52.5%) were NOTCH1 mutated (ICN1+/mutated) and 57 (47.5%) were NOTCH1 wild type (ICN1+/WT). ICN1+ patients had a significant reduction of TTFT compared to ICN1-negative (ICN1-). In the absence of NOTCH1 mutations, we found that the ICN1+/WT group had a significantly reduced TTFT compared to ICN1- patients. The analysis of IGHV mutational status showed that the distribution of the mutated/unmutated IGHV pattern was similar in ICN1+/WT and ICN1- patients. Additionally, TTFT was significantly reduced in ICN1+/ICN2+ and ICN1+/JAG1+ patients compared to ICN1-/ICN2- and ICN1-/JAG1- groups. Our data revealed for the first time that NOTCH1 activation is a negative prognosticator in CLL and is not correlated to NOTCH1 and IGHV mutational status. Activation of NOTCH2 and JAGGED1 expression might also influence clinical outcomes in this group, indicating the need for further dedicated studies. The evaluation of different NOTCH network components might represent a new approach to refine CLL risk stratification.

**Keywords:** risk stratification, NOTCH1 activation, chronic lymphocytic leukemia, IGHV mutation, NOTCH1 mutation

## INTRODUCTION

*NOTCH1* mutations and deregulated signal have been commonly found in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients (1, 2). Clonal *NOTCH1* mutations have been detected in up to 20% of CLL while recent evidence showed that the *NOTCH1* pathway can be constitutively activated independently of mutation in about 50% of patients (3, 4).

However, whereas the impact of *NOTCH1* mutations on the clinical course of CLL has been widely studied (5, 6), the role of *NOTCH1* activation remains to be defined. Furthermore, we previously showed that CLL cells exhibit a constitutively activated *NOTCH2* and express the *JAGGED1* ligand which is involved in IL4-induced CLL cell survival (2, 7–9) whose prognostic role in CLL is largely unknown. A better understanding of the *NOTCH* network in CLL may not only help to refine prognosis, but also expand therapeutic strategies based on the use of single anti-*NOTCH* molecules (10) or their combination with new drugs (11).

In the present retrospective study, we analyzed the role of *NOTCH1/NOTCH2* activation and *JAGGED1* expression in the outcome of CLL patients and weighed up their impact in comparison with *NOTCH1* and *IGHV* mutational status.

## MATERIALS AND METHODS

Neoplastic B cells were obtained from the blood of patients at the diagnosis of CLL using Ficoll density-gradient centrifugation followed by sheep erythrocyte rosetting. The purity of CD19+/CD5+ cells (90%, range 70–99%) was determined by flow cytometry (EPICS-XLMCL; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) analysis using anti-CD45, CD19, CD5, CD11b, CD3 monoclonal antibodies (moAbs) on 7AAD negative (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Western blot (WB) analysis was performed on protein lysates (20 µg) extracted from CLL cells freshly isolated from peripheral blood samples collected at diagnosis, using the Cleaved *NOTCH1* Val1744 (clone D3B8) moAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) to detect activated *NOTCH1* intracellular domain (ICN1+), the polyclonal *NOTCH2* antibody Cleaved-Val1697 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-*JAGGED1* C-terminal (clone TS1.15H) (DSHB Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA) and anti-GAPDH moAb (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Signals were detected using appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Densitometric analysis was performed using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). GAPDH was used as an analysis control. Samples in our cohort were classified as ICN1 negative (ICN1–) when no signal was detected after 30 min exposure (long exposure), while all the others were classified as positive. To exclude technical issues causing false ICN1–, in each WB session, we evaluated the quality of ICN1 staining, loading Molt4 cell line lysate as positive control for delCT mutation, or Jurkat cell line lysate as positive control for *NOTCH1* activation.

Genomic DNA was isolated using the Maxwell<sup>®</sup> system (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and the c.7544–

7545 delCT *NOTCH1* mutation screening was performed using droplet digital PCR (ddPCR) to determine the percentage of allelic burden. The droplet generated included ddPCR Supermix for Probes2x (no dUTP; Bio-Rad), *NOTCH1* probes assays 20x (FAM probe dHsaCP2500500 and HEX Probe dHsaCP2500501; Bio-Rad) and 150 ng of sample DNA. The mix was amplified by PCR according to the probes' data sheet and analyzed by QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Scatter plot analysis specifically determine the *NOTCH1* allelic frequency mutation. The false positive threshold was determined as the upper limit of the mutant allele concentration error bars of the WT control, whereas the value of 0.03% was defined as the lower limit for the *NOTCH1* mutation. Patients with three positive events, out of a total of 10,000, were defined as *NOTCH1* mutated. The value of 20% define the subclonal vs clonal groups.

*IGHV* mutational status was analyzed according to ERIC recommendations.

Statistical analyses were performed with Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Clinical and biological features between groups were compared using the Fisher's exact test for categorical data and the non-parametric Mann-Whitney for non-paired data. Survival was calculated from the date of diagnosis to the date of first treatment (TTFT) or date of death (OS) using the Kaplan-Meier method. A multivariable Cox's regression model was fitted to estimate hazard ratios (HRs) and their 95% confidence intervals (95% CIs), using the R software environment (version 4.0.3). A *p* value < 0.05 was considered significant.

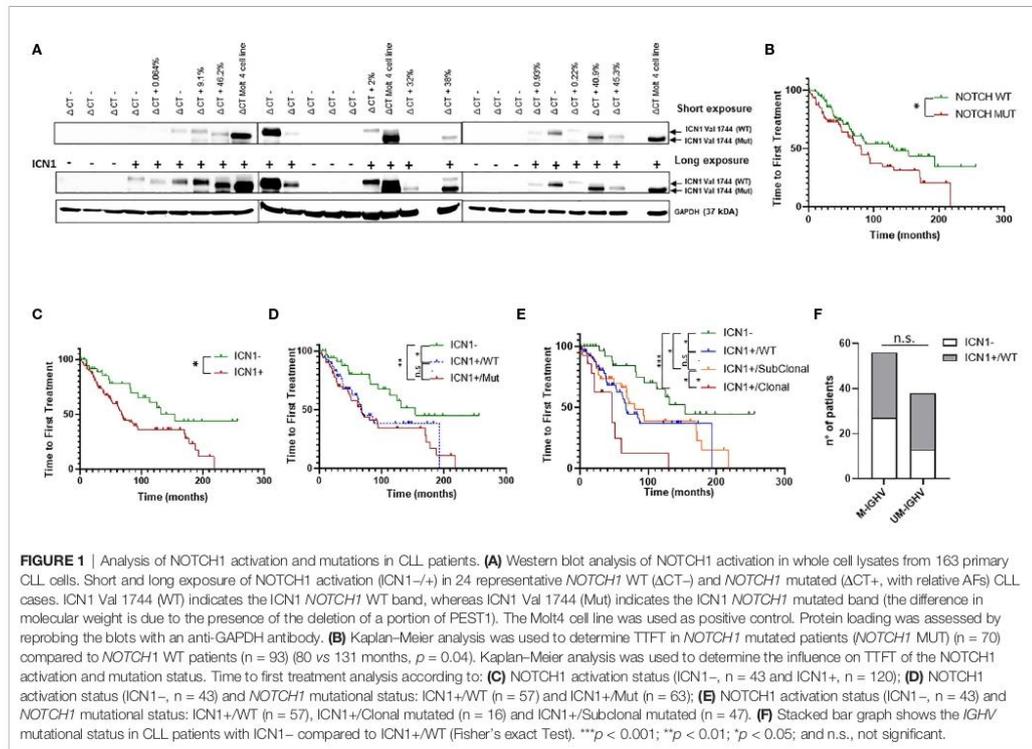
The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee of the University of Perugia, Perugia, Italy (approval 2015–001).

## RESULTS AND DISCUSSION

Peripheral blood samples were obtained from CLL patients at diagnosis after informed consent. Patient characteristics are described in **Supplementary Table 1**.

To identify *NOTCH1* activated CLL cases, we performed Western blot (WB) analysis of the cleaved (Val1744) intracellular domain of *NOTCH1* (ICN1) in 163 patients, which revealed ICN1 expression in 120 samples (73.6%) (**Supplementary Table 1** and **Figure 1A**). Among ICN1+ patients, 63/120 (52.5%) were *NOTCH1* mutated (ICN1+/mutated) while 57/120 (47.5%) were *NOTCH1* WT (ICN1+/WT).

Patients were defined mutated or WT based on the *NOTCH1* allelic frequency (AF) assigned by droplet digital PCR (ddPCR): mutated patients had an AF >0.03%, while WT patients had an AF ≤0.03%. Furthermore, *NOTCH1* mutations were classified as clonal (AF >20%) or subclonal (AF <20%) (**Supplementary Figure 1**). *NOTCH1* subclonal mutations (AF =0.6%) were found only in seven ICN1– patients out of 43 and were not associated with activation of *NOTCH1* signaling, as demonstrated by the absence of ICN1 in WB analysis, even using a long exposure. These data suggest that the activation of the *NOTCH1* pathway is not strictly dependent on the presence of mutations.



Subsequently, we analyzed the TTFT of patients bearing NOTCH1 mutations and we found that it was significantly shorter if compared to the TTFT of patients bearing the WT allele (80 vs 131 months,  $p = 0.04$ ) (Figure 1B). This confirmed the role of the NOTCH1 mutation as a negative prognostic factor in CLL, as reported by Minervini et al., 2016 (3).

Then, we assessed the prognostic significance of ICN1 activation on TTFT and OS, and we found that ICN1+ patients (including both NOTCH1 mutated and WT) had a significant reduction of TTFT compared to ICN1- ( $p < 0.05$ ; Figure 1C). OS was not significantly different (Supplementary Figure 2A). Analysis of ICN1+/mutated versus ICN1+/WT patients showed a similar TTFT (Figure 1D), as well as ICN1-/mutated versus ICN1-/WT patients ( $p = 0.9$ ; data not shown), suggesting that NOTCH1 activation could impact on TTFT regardless of the NOTCH1 mutation. Surprisingly, we found that the ICN1+/WT group had a significantly reduced TTFT compared to ICN1- patients (67 vs 154 months;  $p < 0.05$ ) (Figure 1D). OS was similar in both groups (Supplementary Figure 2B). Furthermore, within ICN1+ patients, when we considered clonal vs. subclonal NOTCH1 mutations, TTFT was significantly reduced in patients carrying a clonal mutations (Figure 1E) suggesting that allelic ratio remains a key factor.

These data suggested that NOTCH1 activation was a negative prognosticator in CLL, regardless the NOTCH1 mutation status. These findings were further strengthened by recent lines of evidence that demonstrated how NOTCH1 signaling is able to induce equivalent transcriptional programs in NOTCH1 mutated and NOTCH1 WT cases (4).

To further explore the prognostic role of NOTCH1 activation in NOTCH1 WT patients, we analyzed its correlation with the IGHV mutational status. Results showed that the distribution of the mutated/unmutated IGHV pattern was similar in ICN1+/WT and ICN1- patients (Figure 1F). Given the poor outcome of ICN1+/WT patients, non-mutated but active NOTCH1 might unveil a new prognostic category with a poor outcome which is not correlated to the IGHV mutational status.

To confirm the role of NOTCH1 activation as an independent prognostic marker in CLL, we performed a multivariate Cox regression analysis, including NOTCH1 mutational status, IGHV status, sex, Rai stage (0-1) and FISH results. Surprisingly, NOTCH1 activation (ICN1+) failed to be significant, if considered alone (Supplementary Table 2). However, if combined (ICN1+/Mut) with NOTCH1 mutational status, which also failed to be an independent prognostic marker when considered alone (3), NOTCH1 activation revealed an

independent prognostic effect on the outcome of interest, even after adjustment for *IGHV* mutational status and other confounders prognosticator (HR: 2.14,  $p = 0.046$ ) (Supplementary Table 2). Separating clonal and subclonal mutations, this prognostic effect is lost in ICN1+/Subclonal patients while it is maintained in ICN1 +/-Clonal patients, confirming what had been demonstrated by the univariate analysis (Figure 1E).

To investigate the role of NOTCH2 activation and JAG1 expression in CLL progression, we performed WB analysis of NOTCH2 (ICN2) and JAG1 expression in 130 patients (Figure 2A) and analyzed their impact on TTFT and OS.

First, to confirm that, also in this group of patients, NOTCH1 activation was a negative prognosticator, we performed WB analysis of ICN1 in 125 patients among the 130 patients in the cohort. The results demonstrated that there was a significant reduction in TTFT between ICN1- and ICN1+ patients (Supplementary Figure 3A) (154 vs. 71 months  $p = 0.041$ ). Furthermore, ICN1- patients had significantly longer TTFT than ICN1+/WT patients (154 vs. 67;  $p < 0.05$ ) and ICN1+/mutated patients (154 vs. 71;  $p < 0.05$ ), while TTFT was similar between ICN1+/WT patients and ICN1+/mutated patients (67 vs. 71;  $p > 0.05$ ), confirming the role of NOTCH1 activation as prognostic marker, not correlated to *NOTCH1* mutation (Supplementary Figure 3B).

The ICN2 protein was positive in 71/130 (55%) while JAG1 in 69/130 (53.1%) samples. Since the prognostic impact of the *NOTCH1* mutation is now well known, samples with *NOTCH1*

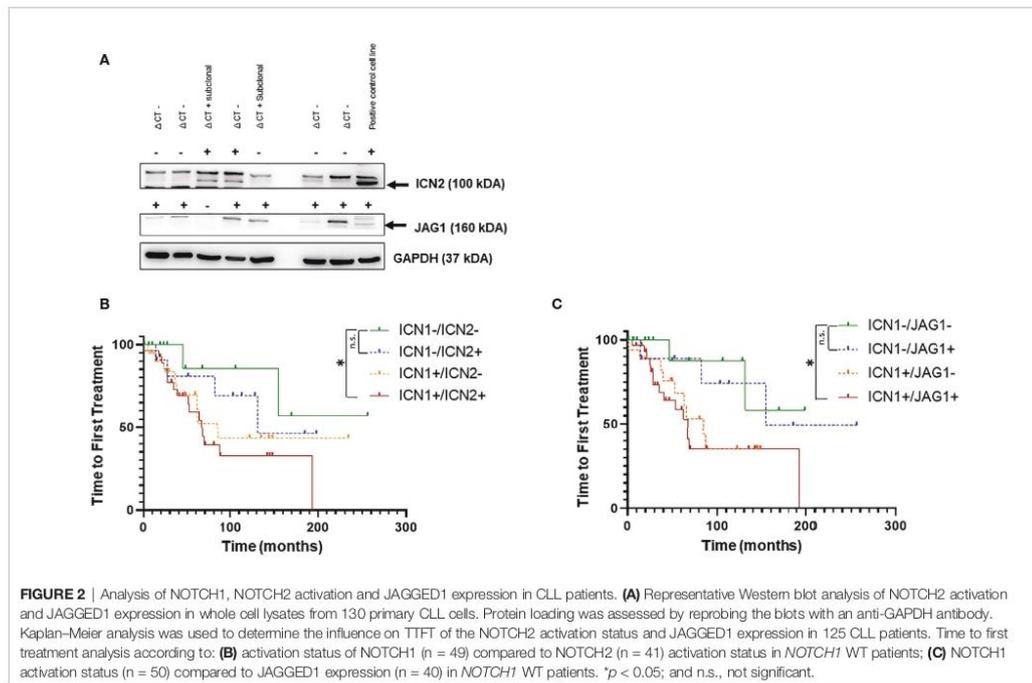
mutation were excluded from the analysis to better define the role of the activation state of ICN1, ICN2 and JAG1 expression. Furthermore, the evaluation of the prognostic impact of ICN2 and JAG1 was performed in patients stratified for the presence or the absence of ICN1.

The expression of ICN2 ( $n = 12$ ) or JAG1 ( $n = 10$ ) alone showed a better TTFT (Figures 2B, C) than activated ICN1 only ( $n = 20$ ) (131 and 154 vs 85 months;  $p = 0.49$ ;  $p = 0.17$ , respectively).

Interestingly, TTFT was significantly reduced in ICN1+/ICN2+ and ICN1+/JAG1+ samples compared to ICN1-/ICN2- and ICN1-/JAG1- (Figures 2B, C;  $p < 0.05$ ). Expression of both ICN1 and ICN2 or JAG1 did not affect OS (Supplementary Figures 2C, D). Altogether, these results are not able to support an additional detrimental effect of ICN2 and JAG1 on CLL outcome when leukemic cells co-express or not ICN1. To clarify this point, further studies on larger cohorts of patients are needed.

Analysis of the concomitant presence of ICN1, ICN2 and JAG1 proteins in 125 patients revealed 9.6% ( $n = 12$ ) triple negative (ICN1-/ICN2-/JAG1-) and 28% ( $n = 35$ ) triple positive (ICN1+/ICN2+/JAG1+) CLL (Supplementary Figure 4A). Interestingly, this latter group showed a tendency toward a reduced TTFT compared to triple negative CLL, in the absence of *NOTCH1* mutations (Supplementary Figure 4B).

Although not significant for the small number of patients analyzed, these data underlie the importance of NOTCH network profiling in CLL.



Altogether, our data provide insights into the prognostic role of NOTCH1 activation in CLL lacking *NOTCH1* mutation. Notably, we have identified ICN1+CLL as a new group of patients with a negative outcome, not correlated to *NOTCH1* and *IGHV* mutational status.

The aberrant NOTCH1 signaling in CLL cells regulates several genes that influence key biological aspects of neoplastic cells, such as apoptosis, cell growth, cell migration, interactions with the microenvironment and B Cell Receptor (BCR) activation. It has been shown that a synergistic cooperation between NOTCH1 and BCR strongly supports the survival/proliferation of CLL cells and contributes to a progression of the disease (11) but also to the transformation into Richter's syndrome (RS) (12). Furthermore, it has been recently shown that ligand-dependent activation of NOTCH1 signaling, *via* constitutive PI3K/AKT activation, promotes CLL transformation towards RS in Eμ-*TCL1* mice *in vivo* (13), thus further supporting the association between non-mutational NOTCH1 activation and a poor prognosis. Based on these notions, the most likely hypothesis is that, in CLL cells, *NOTCH1* mutations, by stabilizing ICN1 levels, potentiate an oncogenic signaling that was initiated by interactions between the NOTCH1 receptor expressed on leukemic cells and ligands expressed on cellular microenvironment (14). Previous data have shown that NOTCH1 activation promotes a genetic program in CLL cells similar to that induced by the *NOTCH1* mutation (4) and our data show, for the first time, a correlation between these transcriptional levels and clinical outcome.

We have also shown that activation of NOTCH2 and JAGGED1 expression might also influence clinical outcomes in ICN1+CLL patients, indicating the need for further dedicated studies. Overall, our data implicate the evaluation of different NOTCH network components as a new approach to refine CLL risk stratification.

However, given the limited size of our cohort, further studies in a larger cohort of patients are needed to confirm the significance of non-mutational NOTCH1 activation and different NOTCH network components in CLL prognosis.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee of the University of Perugia, Perugia, Italy (approval 2015-001). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: SB, BDP, and PS. Development of methodology: SB, BDP, FDF, ED, CR, MN, EM, BF, VG, ER,

and PS. Acquisition of data (acquired and managed patients, provided facilities, etc.): VG and PS. Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): SB, BDP, FDF, ED, CR, EM, MN, FMA, ECSB, VG, ER, MDI, MDN, MM, and PS. Writing, review, and/or revision of the manuscript: SB, BDP, MDI, ER, CS, and PS. Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): SB, BP, FDF, ED, MN, ECSB, FMA, LM, MGM, DS, AS, RG, FG, FU, SP, and PS. Study supervision: PS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This research was funded by the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) (MFAG 2015-ID.17442 Project, and IG 2018-ID.21352 Project to PS); FIRC-AIRC (three-year fellowship "Filomena Todini" ID. 23928 to CR), Italian Ministry of Education, University and Research (MIUR) (Scientific Independence of Young Researchers Project-ID. RBSI14GPBL to PS); Italian Ministry of Health (Ricerca Finalizzata, RF-2016-02364383 to MDI); Gilead Fellowship Program 2016 (to PS) and Associazione Italiana contro le Leucemie-Linfomi e Mieloma (AIL), L'Aquila Section, Italy.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.668573/full#supplementary-material>

**Supplementary Table 1** | Clinical and biological characteristics of the CLL patients analyzed.

**Supplementary Table 2** | Multivariable Cox's regression models included ICN1 activation and NOTCH1 mutation status, IGHV mutational status, Sex, Rai Stage and FISH with a prognosis good (Normal and del13q14 as unique lesion), Intermediate (Trisomy 12) and poor (del 11q23 or del 17p13). \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  and  $p > 0.05$ , not significant.

**Supplementary Figure 1** | Frequency distribution of the *NOTCH1* mutation in 63 CLL patients. According to the ddPCR analysis the patients were stratified in clonal and subclonal mutations.

**Supplementary Figure 2** | Kaplan-Meier estimates of Overall survival (OS) in CLL patients according to: (A) NOTCH1 activation status (ICN1-,  $n=43$  and ICN1+,  $n=120$ ). (B) NOTCH1 activation status (ICN1-,  $n=43$ ) and *NOTCH1* mutational status: ICN1+/WT ( $n=57$ ) and ICN1+/Mut ( $n=63$ ). (C) activation status of NOTCH1 (ICN1+/-) compared to NOTCH2 activation status (ICN2+/-) in *NOTCH1* WT patients. (D) NOTCH1 activation status (ICN1+/-) compared to JAGGED1 expression (JAG1+/-) in *NOTCH1* WT patients.

**Supplementary Figure 3** | Kaplan-Meier estimates the TTF analysis in CLL patients according to: (A) NOTCH1 activation status (ICN1-,  $n=36$  and ICN1+,  $n=89$ ). (B) NOTCH1 activation status (ICN1-,  $n=36$ ) and *NOTCH1* mutational status: ICN1+/WT ( $n=48$ ) and ICN1+/Mut ( $n=41$ ). \*,  $p < 0.05$  and n.s., not significant.

**Supplementary Figure 4** | NOTCH1/NOTCH2 activation and JAGGED1 expression and TTF. (A) Heat map of ICN1, ICN2 and JAG1 status in 125 patients with CLL revealed by Western blot analysis. Kaplan-Meier to evaluate TTF in CLL patients according (B) to triple negative (ICN1-/ICN2-/JAG1-) and triple positive (ICN1+/ICN2+/JAG1+) status.

## REFERENCES

- Di Ianni M, Baldoni S, Rosati E, Ciurnelli R, Cavalli L, Martelli MF, et al. A New Genetic Lesion in B-CLL: A NOTCH1 PEST Domain Mutation. *Br J Haematol* (2009) 146:689–91. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07816.x
- Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively Activated Notch Signaling is Involved in Survival and Apoptosis Resistance of B-CLL Cells. *Blood* (2009) 113:856–65. doi: 10.1182/blood-2008-02-139725
- Minervini A, Minervini CF, Anelli L, Zagaria A, Casieri P, Coccaro N, et al. Droplet Digital PCR Analysis of NOTCH1 Gene Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncotarget* (2016) 7:86469–79. doi: 10.18632/oncotarget.13246
- Fabrizi G, Holmes AB, Viganotti M, Scuoppo C, Belver L, Herranz D, et al. Common Nonmutational NOTCH1 Activation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* (2017) 114:E2911–E9. doi: 10.1073/pnas.1702564114
- Sportoletti P, Baldoni S, Del Papa B, Aureli P, Dorillo E, Ruggeri L, et al. A Revised NOTCH1 Mutation Frequency Still Impacts Survival While the Allele Burden Predicts Early Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* (2014) 28:436–9. doi: 10.1038/leu.2013.289
- Rossi D, Rasi S, Fabrizi G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an Independent Predictor of Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* (2012) 119:521–9. doi: 10.1182/blood-2011-09-379966
- Rosati E, Sabatini R, De Falco F, Del Papa B, Falzetti F, Di Ianni M, et al.  $\gamma$ -Secretase Inhibitor 1 Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells by Proteasome Inhibition, Endoplasmic Reticulum Stress Increase and Notch Down-Regulation. *Int J Cancer* (2013) 132:1940–53. doi: 10.1002/ijc.27863
- De Falco F, Sabatini R, Del Papa B, Falzetti F, Di Ianni M, Sportoletti P, et al. Notch Signaling Sustains the Expression of Mcl-1 and the Activity of eIF4E to Promote Cell Survival in CLL. *Oncotarget* (2015) 6:16559–72. doi: 10.18632/oncotarget.4116
- De Falco F, Del Papa B, Baldoni S, Sabatini R, Falzetti F, Di Ianni M, et al. IL-4-Dependent Jagged1 Expression/Processing is Associated With Survival of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells But Not With Notch Activation. *Cell Death Dis* (2018) 9:1160. doi: 10.1038/s41419-018-1185-6
- Baldoni S, Del Papa B, Dorillo E, Aureli P, De Falco F, Rompietti C, et al. Bepridil Exhibits Anti-Leukemic Activity Associated With NOTCH1 Pathway Inhibition in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Cancer* (2018) 143:958–70. doi: 10.1002/ijc.31355
- Del Papa B, Baldoni S, Dorillo E, De Falco F, Rompietti C, Cecchini D, et al. Decreased NOTCH1 Activation Correlates With Response to Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* (2019) 25:7540–53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1009
- Arruga F, Bracciamà V, Vitale N, Vaisitti T, Gizzi K, Yeomans A, et al. Bidirectional Linkage Between the B-cell Receptor and NOTCH1 in Chronic Lymphocytic Leukemia and in Richter's Syndrome: Therapeutic Implications. *Leukemia* (2020) 34:462–77. doi: 10.1038/s41375-019-0571-0
- Kohlhaas V, Blakemore SJ, Al-Maarri M, Nickel N, Pal M, Roth A, et al. Active Akt Signaling Triggers CLL Toward Richter Transformation Via Overactivation of Notch1. *Blood* (2021) 137:646–60. doi: 10.1182/blood.2020005734
- Arruga F, Gizdic B, Serra S, Vaisitti T, Ciardullo C, Coscia M, et al. Functional Impact of NOTCH1 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* (2014) 28:1060–70. doi: 10.1038/leu.2013.319

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Baldoni, Del Papa, De Falco, Dorillo, Sorrentino, Rompietti, Adamo, Nogarotto, Cecchini, Mondani, Silva Barcelos, Moretti, Mameli, Fabi, Sorcini, Stella, Giancola, Guardalupi, Ulbar, Plebani, Guarente, Rosati, Di Nicola, Marchioni, Di Ianni and Sportoletti. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 6 CONCLUSÕES

Foi identificada associação da variante genética rs9411207 do gene *NOTCH1* com excesso de peso (sobrepeso / obesidade) em uma coorte multiétnica composto somente por idosos. Também, a presença de mutações em *NOTCH1* nos pacientes com LLC está associada com maior resposta integrada ao estresse e resposta ao tratamento com curcumina e combinação com o anti-Bcl2 venetoclax. Tais achados contribuem para o avanço do conhecimento sobre marcadores genéticos para estas doenças complexas. As descobertas deste estudo devem ser estudadas em outras populações a fim de confirmação dos resultados e desenvolvimento de abordagens mais aplicadas voltadas para a medicina de precisão, tanto na identificação de indivíduos em risco, quanto em relação à resposta terapêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLE, G. G.; BATISTA, L. H. Promoção da saúde e prevenção de incapacidades funcionais dos idosos na estratégia de saúde da família. **Saúde debate**, v. 37, n. 96, p. 10–19, 2013.
- ANGELO, L. S.; KURZROCK, R. Turmeric and Green Tea: A Recipe for the Treatment of B-Chronic Lymphocytic Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 1123–1125, 15 fev. 2009.
- ARDLIE, K. G. et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. **Science**, v. 348, n. 6235, p. 648–660, 8 maio 2015.
- ARRUGA, F.; VAISITTI, T.; DEAGLIO, S. **The NOTCH pathway and its mutations in mature B cell malignancies** *Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 26 nov. 2018. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 21 abr. 2021
- BANDARANAYAKE, T.; SHAW, A. C. Host Resistance and Immune Aging. 2016.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.
- BEARD, J. R. et al. The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10033, p. 2145–2154, 21 maio 2016.
- BERRY, L. W.; WESTLUND, B.; SCHEDL, T. Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a Caenorhabditis elegans member of the Notch family of receptors. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 4, p. 925–36, fev. 1997.
- BI, P. et al. Notch signaling regulates adipose browning and energy metabolism. **Nature Medicine**, v. 20, n. 8, p. 911–918, 2014a.
- BI, P. et al. Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity. **Nature Medicine** 2014 20:8, v. 20, n. 8, p. 911–918, 20 jul. 2014b.
- BOUCHER, J. M. et al. Pathological Conversion of Mouse Perivascular Adipose

Tissue by Notch Activation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 40, p. 2227–2243, 2020.

BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 1 set. 2012.

BRIDE, L. et al. TCF7L2 rs7903146 polymorphism association with diabetes and obesity in an elderly cohort from Brazil. **PeerJ**, v. 9, p. e11349, 5 maio 2021.

BRUCE, B.; JOEL W, C.; JONATHAN L, T. Climate change, human health, and epidemiological transition. **Preventive medicine**, v. 70, p. 69–75, 1 jan. 2015.

BULL, L. Genetics, Mutations, and Polymorphisms. 2013.

C, A. et al. Caloric restriction in lean and obese strains of laboratory rat: effects on body composition, metabolism, growth and overall health. **Experimental physiology**, v. 100, n. 11, p. 1280–1297, 1 nov. 2015.

CAO, Y.-W. et al. Notch1 single nucleotide polymorphism rs3124591 is associated with the risk of development of invasive ductal breast carcinoma in a Chinese population. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 7, p. 4286–94, 2014.

CAPACCIONE, K. M.; PINE, S. R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 7, p. 1420–1430, 1 jul. 2013.

CARSTEN T, H.; FIORAN W, K. Adipose tissue browning in mice and humans. **The Journal of endocrinology**, v. 241, n. 3, p. R97–R109, 2019.

CASTRO, M. C. et al. Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. **Nature Medicine**, jun. 2021.

CORMIER-DAIRE, V. et al. Cryptic terminal deletion of chromosome 9q34: A novel cause of syndromic obesity in childhood? **Journal of Medical Genetics**, v. 40, n. 4, p. 300–303, 2003.

COYLE, P. K. Pharmacogenetic Biomarkers to Predict Treatment Response in Multiple Sclerosis: Current and Future Perspectives. **Multiple Sclerosis International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

CRAWFORD, D. C.; NICKERSON, D. A. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. **Annual Review of Medicine**, v. 56, n. 1, fev. 2005.

DEREK M, H.; N, B. Contribution of adipose tissue to health span and longevity. **Interdisciplinary topics in gerontology**, v. 37, p. 1–19, 2010.

DING, E. et al. Notch polymorphisms associated with sensitivity of noise induced hearing loss among Chinese textile factory workers. **BMC Medical Genetics 2018 19:1**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 14 set. 2018a.

DING, L. et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. **Cell**, v. 173, p. 305–320, 2018b.

DUARTE, Y. A. DE O. et al. Fragilidade em idosos no município de São Paulo: prevalência e fatores associados. **Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology**, v. 21Suppl 02, n. Suppl 2, p. e180021, 2019.

ELLEGREN, H.; GALTIER, N. Determinants of genetic diversity. **Nature Reviews Genetics 2016 17:7**, v. 17, n. 7, p. 422–433, 6 jun. 2016.

FABBRI, G. et al. Common nonmutational NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 14, p. E2911–E2919, 4 abr. 2017.

FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. **Nature Reviews Cardiology 2018 15:9**, v. 15, n. 9, p. 505–522, 31 jul. 2018.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216–229, abr. 2006.

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 244–254, 2000.

FRANCESCO, P. et al. Short-term sustained hyperglycaemia fosters an archetypal senescence-associated secretory phenotype in endothelial cells and macrophages.

**Redox biology**, v. 15, p. 170–181, 1 maio 2018.

FRE, S. et al. Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 19, p. 2740–2747, 15 nov. 2011.

GABRIEL, S. B. et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225–2229, 21 jun. 2002.

GARG, V. et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. **Nature**, v. 437, n. 7056, p. 270–274, 17 set. 2005.

GONÇALVES, M. V. et al. Chronic lymphocytic leukemia in Brazil: A retrospective analysis of 1903 cases. **American Journal of Hematology**, v. 92, n. 8, p. E171–E173, ago. 2017.

GONZÁLEZ, J. R. et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 644–645, 1 mar. 2007.

GREENWALD, I.; KOVALL, R. Notch signaling: genetics and structure. **WormBook**, p. 1–28, 17 jan. 2013.

GUO, L. et al. rVarBase: An updated database for regulatory features of human variants. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D888–D893, 2016.

H, Z.; R, P.; MH, G. Haplotype analysis in population genetics and association studies. **Pharmacogenomics**, v. 4, n. 2, p. 171–178, mar. 2003.

HALASCHEK-WIENER, J. et al. Genetic Variation in Healthy Oldest-Old. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6641, 14 ago. 2009.

HALLEK, M. et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. **Blood**, v. 131, n. 25, p. 2745–2760, 21 jun. 2018.

HARMAN, D. The aging process. **Basic life sciences**, v. 49, p. 1057–65, 1988.

HAYNES, L. Aging of the Immune System: Research Challenges to Enhance the Health Span of Older Adults. **Frontiers in Aging**, v. 0, p. 2, 15 out. 2020.

HÖFELMANN, D. A. et al. Chronic diseases and socioeconomic inequalities in quality of life among Brazilian adults: findings from a population-based study in Southern Brazil. **European Journal of Public Health**, v. 28, n. 4, p. 603–610, 1 ago. 2018.

HORI, K.; SEN, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 10, p. 2135–2140, 15 maio 2013.

HUNTER, D. J.; REDDY, K. S. Noncommunicable Diseases. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1109345>, v. 369, n. 14, p. 1336–1343, 2 out. 2013.

IANNI, M. DI et al. **A new genetic lesion in B-CLL: A NOTCH1 PEST domain mutation****British Journal of Haematology**, 2009.

IBGE. **IBGE | Projeção da população**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Acesso em: 22 set. 2019.

ISMAIL, S.; ESSAWI, M. Genetic polymorphism studies in humans. **Middle East Journal of Medical Genetics**, v. 1, n. 2, p. 57–63, jul. 2012.

JAUL, E.; BARRON, J. Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. **Frontiers in Public Health**, v. 5, 11 dez. 2017.

JEREMY D, W. Sarcopenia in older adults. **Current opinion in rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 623–627, nov. 2012.

KENNEDY, B. K. et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 709–13, 6 nov. 2014.

KIRSI A, V. The rediscovery of BAT in adult humans using imaging. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 30, n. 4, p. 471–477, 1 ago. 2016.

KOCAL, G. C.; BASKIN, Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. **Genetic Polymorphisms**, 6 set. 2017.

KOCZIAN, F. et al. Targeting the endoplasmic reticulummitochondria interface sensitizes leukemia cells to cytostatics. **Haematologica**, v. 104, n. 3, p. 546–555, 28

fev. 2019.

KRISS, C. L. et al. Overexpression of TCL1 activates the endoplasmic reticulum stress response: A novel mechanism of leukemic progression in mice. **Blood**, v. 120, n. 5, p. 1027–1038, 2 ago. 2012.

KUMAR, V.; SHANBHAG, L. Curcumin in chronic lymphocytic leukemia- A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Shanbhag VKL**, 2017.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. **Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials** *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* Taylor and Francis Ltd, , 2 set. 2019.

KUROOKA, H.; KURODA, K.; HONJO, T. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse Notch1 intracellular region. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 23, p. 5448–5455, 1 dez. 1998.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794–798, 25 ago. 2016.

LAURA M, P. et al. “Adipaging”: ageing and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 12, p. 3187–3207, 15 jun. 2016.

LI, L. J. et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on autophagy and apoptosis of human leukemia cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 6, p. 7886–7892, 1 jun. 2018.

LIU, J. et al. Notch Signaling in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 92, n. C, p. 367–409, 1 jan. 2010.

LOCKE, A. E. et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature 2015 518:7538**, v. 518, n. 7538, p. 197–206, 11 fev. 2015.

LÓPEZ-OTÍN, C. et al. The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1194–1217, 6 jun. 2013.

MA, M. et al. Chronic non-communicable diseases and COVID-19: EPICOVID-19 Brazil results. **Revista de saude publica**, v. 55, p. 38, 2021.

MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases Hindorff5,. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747–753, 2009.

MARIE, N. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9945, p. 766–781, 2014.

MATUTES, E. et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. **Leukemia**, v. 8, n. 10, p. 1640–5, out. 1994.

MCBRIDE, K. L. et al. NOTCH1 mutations in individuals with left ventricular outflow tract malformations reduce ligand-induced signaling. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 18, p. 2886–2893, 15 set. 2008.

MCCOMB, S. et al. Efficient apoptosis requires feedback amplification of upstream apoptotic signals by effector caspase-3 or -7. **Science Advances**, v. 5, n. 7, p. 9433–9464, 31 jul. 2019.

MICHAEL B, S. et al. Physiological Aging: Links Among Adipose Tissue Dysfunction, Diabetes, and Frailty. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 32, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 2017.

MOHR, O. L. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. **Genetics**, v. 4, n. 3, p. 275–82, maio 1919.

MOUSTAPHA, A. et al. Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. **Cell Death Discovery**, v. 1, n. 1, p. 15017, 26 dez. 2015.

MULLEN, S. A. et al. A neurologist's guide to genome-wide association studies. **Neurology**, v. 72, n. 6, p. 558–565, 10 fev. 2009.

NADEU, F. et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 127, n. 17,

p. 2122–2130, 2016.

NASLAVSKY, M. S. et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human Mutation**, v. 38, n. 7, p. 751–763, jul. 2017.

NASLAVSKY, M. S. et al. **Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil)**bioRxivbioRxiv, , 16 set. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.09.15.298026>>. Acesso em: 26 abr. 2021

NG, A. P. P.; CHNG, W. J.; KHAN, M. Curcumin sensitizes acute promyelocytic leukemia cells to unfolded protein response-induced apoptosis by blocking the loss of misfolded N-CoR protein. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 878–888, jul. 2011.

NICCOLI, T.; PARTRIDGE, L. Ageing as a Risk Factor for Disease. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R741–R752, 11 set. 2012.

NYAGA, D. M. et al. Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Genetic Variants Contribute to Overlapping Immune Regulatory Networks. **Frontiers in Genetics**, v. 0, p. 535, 21 nov. 2018.

PAE, H. O. et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 4, p. 1040–1045, 23 fev. 2007.

PHAN, L. et al. **ALFA: Allele Frequency Aggregator**. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa)>.

PUENTE, X. S. et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 101–105, 5 jul. 2011.

PUENTE, X. S. et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. **Nature**, v. 526, n. 7574, p. 519–524, 22 out. 2015.

QUAN, X. et al. Single nucleotide polymorphism rs3124599 in Notch1 is associated with the risk of lung cancer in northeast Chinese non-smoking females. **Oncotarget**,

v. 8, n. 19, p. 31180, 2017.

RACHEL, N. Preventing and managing chronic diseases. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 364, 31 jan. 2019.

RADHIKA, M. et al. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. **Aging cell**, v. 7, n. 3, p. 438–440, jun. 2008.

RAI, K. R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 3, p. 330–340, 1 mar. 2016.

REN, Y. et al. Curcumin relieves paraquat-induced lung injury through inhibiting the thioredoxin interacting protein/NLR pyrin domain containing 3-mediated inflammatory pathway. **Molecular medicine reports**, v. 20, n. 6, p. 5032–5040, 1 dez. 2019.

REXFORD S, A. Connecting obesity, aging and diabetes. **Nature medicine**, v. 15, n. 9, p. 996–997, set. 2009.

RIBEIRO, D. R. et al. PREVALÊNCIA DE DIABETES MELLITUS E HIPERTENSÃO EM IDOSOS. **Revista Artigos.Com**, v. 14, p. 2–7, 2020.

RICHARD MATTHEW, D. et al. Prevalence and incidence of sarcopenia in the very old: findings from the Newcastle 85+ Study. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 8, n. 2, p. 229–237, 1 abr. 2017.

ROSATI, E. et al. Novel targets for endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in B-CLL. **Blood**, v. 116, n. 15, p. 2713–2723, 14 out. 2010.

ROSATI, E. et al.  $\gamma$ -Secretase inhibitor I induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress increase and notch down-regulation. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 000, 2012.

ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 229, 2018a.

ROSATI, E. et al. NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 229, 2018b.

ROSS, D. A.; RAO, P. K.; KADESCH, T. Dual Roles for the Notch Target Gene Hes-1 in the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes . **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 8, p. 3505–3513, 15 abr. 2004.

SANGMI, K. et al. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 3, p. 816–820, mar. 2009.

SCHAID, D. J. et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 2, p. 425–434, 1 fev. 2002.

SCOTT, R. A. et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. **Diabetes**, v. 66, n. 11, p. 2888–2902, nov. 2017.

SHAH, P. A. et al. NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2677, 2020.

SIEBEL, C.; LENDAHL, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. **Physiol Rev**, v. 97, p. 1235–1294, 2017.

SIMÕES, C. C. S. Breve histórico do processo demográfico. **Brasil: uma visão geográfica e ambiental no início do século XXI**, 2016.

SPORTOLETTI, P. et al. **NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL***British Journal of Haematology* Br J Haematol, , nov. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813007/>>. Acesso em: 21 abr. 2021

STEINE, I. M. et al. Implication of NOTCH1 gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims. **Translational Psychiatry**, v. 6, p. 1–9, 2016.

TAM, V. et al. Benefits and limitations of genome-wide association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 8, p. 467–484, 1 ago. 2019.

THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A haplotype map of the human

genome. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1299–1320, out. 2005.

TING, L. et al. Glucose reduction prevents replicative senescence and increases mitochondrial respiration in human mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 6, p. 813–825, 2011.

TIZHONG, S. et al. Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 8, p. 2214–2224, ago. 2013.

VASTRAD, B. et al. Bioinformatics Analysis of Key Genes and Pathways for Obesity Associated Type 2 Diabetes Mellitus as a Therapeutic Target. **bioRxiv**, p. 2020.12.25.424383, 27 dez. 2020.

WALL, J. D.; PRITCHARD, J. K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 587–597, 1 ago. 2003.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg v4: Systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D877–D881, 2016.

WHITEHEAD, A. et al. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. **Nature Communications** **2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 26 mar. 2021.

WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

WHO. **Noncommunicable diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 26 ago. 2021.

WILD, P. S. et al. Large-scale genome-wide analysis identifies genetic variants associated with cardiac structure and function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 5, p. 1798–1812, 10 abr. 2017.

WRIGHT, A. F. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. **Encyclopedia of Life Sciences**, 23 set. 2005.

YAMAMOTO, S.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. Introduction to Notch Signaling. In:

**Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).** [s.l.: s.n.]. v. 1187p. 1–14.

YANG, S.-M. et al. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology? **Blood Reviews**, v. 29, n. 3, p. 205–213, 1 maio 2015.

ZHANG, M. et al. Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? **Cancer Medicine**, v. 5, n. 8, p. 2048, 1 ago. 2016.

ZOICO, E. et al. Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. **Frontiers in Endocrinology**, v. 0, n. JUN, p. 368, 2019.

ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R. Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. **Nature protocols**, v. 2, n. 10, p. 2492, 2007.

**ANEXOS - CERTIFICAÇÃO ÉTICA E LEGAL DO PRESENTE ESTUDO**


**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

 Faculdade de Saúde Pública  
 Universidade de São Paulo

**OF.COEP/05/15**

25 de maio de 2015.

Prezada Professora,

O projeto de pesquisa n.º **2044**, intitulado **“ESTUDO SABE II 2010: SAÚDE, BEM-ESTAR E ENVELHECIMENTO – ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS CONDIÇÕES DE VIDA E SAÚDE DOS IDOSOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO”**, já havia sido considerado aprovado por este Comitê. Em razão de emenda, informando sobre a intenção de envio de material biológico (genético) dos sujeitos da pesquisa ao exterior, este projeto fora encaminhado à CONEP. O material biológico de cerca de 1400 pessoas, coletado em etapas anteriores da mesma pesquisa, estava congelado sob a guarda da pesquisadora. Neste momento do estabelecimento de parceria internacional de pesquisa, a CONEP manifestou-se favorável à aprovação desde que se atendesse a uma lista de sugestões/recomendações.

Dessa forma, a proponente forneceu respostas às 5 recomendações, incluindo um cronograma, planilha orçamentária e esclarecimento sobre custeio.

A folha de rosto anexada agora contém data e assinaturas solicitadas pela CONEP, apresentando-se adequada nesta versão. O orçamento, que é elevado, está sendo coberto pela Fapesp ou está em franca negociação com a *Human Longevity Inc.* O cronograma solicitado também foi apresentado. A tradução do documento *“Declaration of Intention”* foi adequadamente apresentada. O TCLE sofreu todas as modificações sugeridas pela CONEP.

Tendo a CONEP se manifestado pela aprovação e tendo este CEP verificado o cumprimento das recomendações reitera a aprovação da presente emenda.

Atenciosamente,

**Prof.ª Tit. Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vivolo**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª

 Prof.ª Tit. **Maria Lúcia Lebrão**

USP - FACULDADE DE SAÚDE  
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FSP/USP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO SABE - SAÚDE, BEM-ESTAR E ENVELHECIMENTO - Coorte 2015

Estudo longitudinal de múltiplas coortes sobre as condições de vida e saúde dos idosos no Município de São Paulo.

**Pesquisador:** YEDA APARECIDA DE OLIVEIRA DUARTE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47683115.4.0000.5421

**Instituição Proponente:** Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - FSP/USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.600.782

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto temático sobre saúde do idoso, com base em amostra representativa e seguimento longitudinal (4a onda) de residentes na cidade de São Paulo.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Descrever e analisar padrões de vida e de saúde de idosos na cidade de São Paulo, bem como de seus determinantes e fatores associados.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto equacionou adequadamente a avaliação de riscos e benefícios. Já foi aprovado para as ondas anteriores e já havia sido aprovado quanto a esse quesito para a corrente avaliação da 4a onda do seguimento longitudinal.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A única pendência levantada dizia respeito à solicitação de informações adicionais quanto ao envio ao exterior de amostras de sangue para a realização de exames genéticos de interesse para o estudo.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os termos obrigatórios. O TCLE informa adequadamente aos participantes do

**Endereço:** Av. Doutor Arnaldo, 715  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 01.246-904  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3061-7779 **Fax:** (11)3061-7779 **E-mail:** coep@fsp.usp.br



ESTUDO S A B E  
SAÚDE, BEM ESTAR E ENVELHECIMENTO

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Estudo S A B E é um estudo sobre as condições de vida e saúde das pessoas com idade igual ou superior a 60 anos residentes no Município de São Paulo. O referido estudo iniciou no ano de 2000 e teve continuidade em 2006 e, novamente, em 2010 quando todos os participantes do estudo inicial que foram localizados, foram revisitados e reentrevistados. O estudo é coordenado pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Ministério da Saúde.

Em 2010 o Sr(a) participou desse Estudo quando, após sua autorização, foram colhidas amostras de sangue, por pessoal capacitado e treinado para esse fim, supervisionado por equipe qualificada, seguindo rotinas padronizadas. Com uma parte dessas amostras foram realizados exames de laboratório específicos cujos resultados foram enviados, na época, para o(a) Sr(a) acompanhado de orientação a cada caso. Outra parte dessas amostras de sangue ficaram estocadas em laboratório específico para esse fim situado no Centro de Pesquisas sobre Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da USP sob a responsabilidade da Profª Drª Mayana Zatz.

Nesse momento estamos iniciando dois novos estudos que irão utilizar as amostras de sangue coletadas em 2010 e congeladas desde então. Por essa razão, estamos novamente entrando em contato com o(a) Sr(a) para solicitar sua autorização para utilizar sua amostra de sangue coletada em 2010, que está estocada. Assim, não será necessário coletar nova amostra de sangue.

Os estudos que vamos desenvolver são:

1. Sequenciamento genético completo realizado por grupos de pesquisadores especializados no Brasil, nos Estados Unidos e na Inglaterra;
2. Análise da proporção de pessoas idosas que, durante a vida, possam ter sido infectadas por vírus relacionados a doenças sexualmente transmissíveis como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV),



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS**

**Variabilidade genética em *NOTCH1*: associação com o excesso de peso e implicações terapêuticas na Leucemia Linfocítica Crônica em idosos**

VITÓRIA  
2021

ESTEVÃO CARLOS SILVA BARCELOS

2021

PPGBiotec