

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

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

**POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS EM *NOTCH1*
ESTÃO ASSOCIADOS AO RDW**

VITÓRIA

2022

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

**POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS EM *NOTCH1*
ESTÃO ASSOCIADOS AO RDW**

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia de Paula

Coorientadora: Prof^a Dr^a Flávia Imbroisi Valle Errera

VITÓRIA

2022

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

F363p Fernandes, Izadora Silveira, 1999-
Polimorfismos e haplótipos em NOTCH1 estão associados ao
RDW / Izadora Silveira Fernandes. - 2022.
69 f. : il.

Orientadora: Flávia de Paula.

Coorientadora: Flávia Imbroisi Valle Errera.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Genética da população humana. 2. Biotecnologia. 3.
Polimorfismo (genética). 4. Genética e biologia molecular. I.
Paula, Flávia de. II. Errera, Flávia Imbroisi Valle. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

**POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS EM *NOTCH1*
ESTÃO ASSOCIADOS AO RDW**

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 17 de agosto de 2022.

Prof^a. Dr^a. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Flávia Imbroisi Valle Errera
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno titular

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno suplente

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora
Membro externo titular

Prof. Dr. Michel Naslavsky
Universidade de São Paulo
Membro externo suplente

VITÓRIA

2022

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

**POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS EM *NOTCH1*
ESTÃO ASSOCIADOS AO RDW**

Dissertação 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 Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 17 de agosto de 2022.

**Universidade Federal do Espírito Santo
Prof^a. Dr^a. Flávia de Paula**

**Universidade Federal do Espírito Santo
Prof^a. Dr^a. Flávia Imbroisi Valle Errera**

VITÓRIA

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus maiores incentivadores,

Gratidão à Deus, pela coragem para iniciar o mestrado e a oportunidade de finalizá-lo.

Aos meus pais, Terezinha Silveira e Tarciso Fernandes que me incentivaram durante todo o percurso e acreditaram em mim mais do que eu.

Ao meu namorado Bryan Martins, por me acalmar sempre que algo não acontecia como o planejado.

Às minhas orientadoras Flavia de Paula e Flávia Errera, que me acolheram e apoiaram a cada passo. Obrigada por toda a paciência e zelo na construção deste trabalho.

Aos meus professores, por me inspirarem e me ensinarem como ser uma profissional de valor. Em especial à professora Lucia Pimassoni, pela paciência ao me ajudar a interpretar as análises estatísticas.

Ao meu colega, agora Doutor, Estevão Barcelos, que introduziu a programação na minha vida e aos demais colegas que percorreram esse caminho comigo: Valdemir Pereira, Lais Bride, Matheus Casotti, Vinicius Ventorim e toda a equipe do Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM).

Aos membros da banca avaliadora, os professores Sonia Gouvea, Carlos Magno Maranduba, Breno Nogueira e Michel Naslavsky, por aceitarem participar dessa última avaliação.

Agradeço a toda a equipe envolvida no estudo SABE, desenvolvido em parceria com a Universidade de São Paulo, em especial aos professores Michel Naslavsky, Maria Rita Passos Bueno e Mayana Zatz pelo auxílio a nossa equipe.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e à agência de fomento CAPES por tornarem o meu mestrado possível.

Obrigada por acreditarem em mim! Dedico a vocês este trabalho e todas as conquistas que sei que virão a partir dele.

A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada.

Karl Popper

RESUMO

FERNANDES, I. S. **Polimorfismos e Haplótipos em *NOTCH1* Estão Associados ao RDW**. 2022. 70pg. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2022.

A anisocitose ou variabilidade na amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW) aumenta com a idade e é preditiva de doenças cardiovasculares, câncer, infecções, envelhecimento, morbimortalidade e outros. Dadas as implicações e potencial clínico deste marcador, é importante identificar genes e polimorfismos genéticos associados à sua variabilidade em diferentes populações. No Catálogo GWAS, SNPs em alguns genes, incluindo *NOTCH1*, estão associados ao RDW. *NOTCH1* atua na via Notch, crucial para a embriogênese, proliferação e apoptose, metabolismo, desenvolvimento e para o funcionamento dos sistemas nervoso, cardiovascular e endócrino. O objetivo deste trabalho foi validar a associação entre RDW e o SNP rs3124592 do gene *NOTCH1*, descrito no Catálogo GWAS, e identificar SNPs associados ao RDW na população brasileira. Participantes da coorte de idosos “Saúde, Bem-Estar e Envelhecimento” (SABE) foram estratificados em casos e controles de acordo com os valores de RDW. Os casos foram definidos pelo valor do coeficiente de variação do RDW $\geq 15\%$. Filtramos os SNPs localizados nas posições inicial e final de *NOTCH1* e 50Kb em ambos os lados. Excluímos In/Dels e SNPs não anotados. Selecionamos SNPs com frequência alélica menor (MAF) maior ou igual a 0.01 e equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) e $r^2 \geq 0.8$. Foram incluídos 1097 participantes, com mediana da idade de 71.69 anos, sendo 703 mulheres (64.08%). Desses, 134 (12.22%) indivíduos apresentaram RDW $\geq 15\%$. Do total de 5599 SNPs, 226 Tag SNPs foram analisadas. O SNP rs3124592, do Catálogo GWAS, não foi associado ao RDW nessa população. Após ajuste para idade, gênero e ancestralidade e considerando a correção de Bonferroni, a análise mostrou a associação entre RDW elevado e o SNP rs9411206 no modelo log-aditivo, sendo a frequência do genótipo GG maior em casos (57.5%) do que em controles (40.7%) ($p = 0.0001477$). As variantes rs2229971 ($p = 0.0001673$), rs9411207 ($p = 0.0002309$) e rs11574891 ($p = 0.0002440$) estão associadas ao RDW no modelo recessivo. Após o ajuste para idade, gênero, ancestralidade, PAD, Hb1Ac, LDL, hsCRP, hemoglobina e AVC, os mesmos SNPs permaneceram associados, exceto o rs9411206. Foram observadas associações principalmente no modelo recessivo: rs2229971 ($p = 0.00006304$);

rs9411207 ($p= 0.00007347$) e rs11574891 ($p= 0.00002759$). Após esse ajuste, o rs9411206 foi marginalmente associado nos modelos dominante ($p= 0.0004790930$) e aditivo ($p= 0.000461617$). Desses SNPs, o rs9411206 é o único que possui eQTLs e sQTLs identificados na análise *in silico*, com resultados principalmente no sangue. O rs2229971 está associado a abundância de RNAm. O *Regulome* indica o potencial destes SNPs afetarem os níveis de expressão gênica, sendo o rs11574891 o mais representativo desta análise. No *HaploReg* todas as variantes estão associadas a *enhancers* no pulmão, ventrículo direito, cérebro e baço, bem como modificações epigenéticas do tipo H3K4me1 no cérebro e pâncreas. Em conclusão, o rs3124592 não foi validado na população estudada, contudo, foram identificadas novas variantes associadas ao RDW: rs2229971, rs9411207, rs11574891 e rs9411206. Assim, nossos dados sugerem que estes SNPs estão associados a níveis elevados de RDW e podem ser avaliados como biomarcadores de doenças crônicas e do envelhecimento, corroborando evidências recentes em culturas celulares, modelos animais e estudos clínicos.

Palavras-chave: Contagem de células sanguíneas. *NOTCH1*. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Haplótipo. Envelhecimento.

ABSTRACT

FERNANDES, I. S. **Polymorphisms and Haplotypes in *NOTCH1* are associated with RDW.** 2022. 70pg. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Postgraduation Biotechnological Programme, Federal University of Espírito Santo, Vitória, 2022.

Anisocytosis or Red Cell Distribution Width (RDW) increases with age and is predictive of cardiovascular disease, cancer, infections, aging, morbidity and mortality and others. Given the implications and clinical potential of this marker, it is important to identify genes and genetic polymorphisms associated with variability in different populations. In GWAS Catalog, SNPs in some genes, including *NOTCH1*, are associated with RDW. *NOTCH1* acts in Notch pathway, crucial for embryogenesis, proliferation and apoptosis, metabolism, development and for functioning of the nervous, cardiovascular and endocrine systems. The objective of this work is to validate association between RDW and rs3124592 of *NOTCH1* gene, described in the GWAS Catalog, and to identify SNPs associated with RDW in the Brazilian population. Participants in the “Health, Well-being and Aging” (SABE) cohort of older adults were stratified into cases and controls according to RDW values. The cases were defined by the value of coefficient of variation of RDW $\geq 15\%$. We filter SNPs located at start and end positions of *NOTCH1* and 50Kb on both sides. We exclude In/Dels and unannotated SNPs. We selected SNPs with minor allelic frequency (MAF) greater than or equal to 0.01 and Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) and $r^2 \geq 0.8$. A total of 1097 participants were included, with a median age of 71.69 years, of which 703 are women (64.08%). Of these, 134 (12.22%) individuals have RDW $\geq 15\%$. From a total of 5599 SNPs, 226 Tag SNPs were analyzed. SNP rs3124592, from the GWAS Catalog, was not associated with RDW in this population. After adjusting for age, gender and ancestry and considering the Bonferroni correction, the analysis showed an association between high RDW and SNP rs9411206 in the log-additive model, with the frequency of GG genotype being higher in cases (57.5%) than controls (40.7%) ($p = 0.0001477$). The variants rs2229971 ($p = 0.0001673$), rs9411207 ($p = 0.0002309$) and rs11574891 ($p = 0.0002440$) are associated with RDW in recessive model. After adjusting for age, gender, ancestry, DBP, Hb1Ac, LDL, hsCRP, hemoglobin, and stroke, the same SNPs remained associated, except for rs9411206. Associations were observed mainly in the recessive model: rs2229971 ($p = 0.00006304$); rs9411207

($p=0.00007347$) and rs11574891 ($p=0.00002759$). After this adjustment, rs9411206 was marginally associated in dominant ($p= 0.0004790930$) and additive ($p= 0.000461617$) models. Of these SNPs, rs9411206 is the only one that has eQTLs and sQTLs identified in “in silico” analysis, with results mainly in blood. rs2229971 is associated with mRNA abundance. Regulome indicates the potential of these SNPs to affect gene expression levels and rs11574891 is the most representative of this analysis. In HaploReg, all variants are associated with enhancers in lung, right ventricle, brain and spleen, as well as epigenetic modifications of histone protein H3K4me1 in brain and pancreas. In conclusion, rs3124592 was not validated in this population, however, new variants associated with RDW were identified: rs2229971, rs9411207, rs11574891 and rs9411206. Thus, our data suggest that these SNPs are associated with elevated levels of RDW and can be evaluated as biomarkers of chronic diseases and aging, corroborating recent evidence in cell cultures, animal models and clinical studies.

Keywords: Blood cell count. *NOTCH1*. Single Nucleotide Polymorphism. Haplotype. Aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da proteína: subunidades e domínios em <i>NOTCH1</i>	23
Figura 2 - Via de sinalização NOTCH enfatizando <i>NOTCH1</i>	24
Figura 3 - Localização genômica do <i>NOTCH1</i>	24
Figura 4 - Modelo 1	33
Figura 5 - Modelo 2.	34
Figura 6 - Bloco Haplotípico rs9411206_rs2229971_rs11574891_rs9411207	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para alto RDW de acordo com a literatura.....	19
Tabela 2 - Características clínicas, antropométricas, sociodemográficas e de ancestralidade da coorte SABE.....	31
Tabela 3 - Análise de associação de acordo com diferentes modelos genéticos	35
Tabela 4 - Haplótipos mais comuns com base nos SNPs rs9411206_rs2229971_rs11574891_rs9411207.....	38
Tabela 5 - Análise <i>in silico</i> dos SNPs nos bancos rVarBase e Haploreg	40
Tabela Suplementar 1 - Frequências dos SNPs em diferentes populações mundiais de acordo com diversos projetos de genômica.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALFA	Agregador de frequência de alelos (do inglês <i>Allele Frequency Aggregator</i>)
AGPAT2	1-Aciliglicerol-3-Fosfato O-Aciltransferase 2 (do inglês <i>1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 2</i>)
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C9orf163	(do inglês <i>Chromosome 9 Open Reading Frame 163</i>)
CBFA2T	Co-repressor transcricional parceiro CBFA2/RUNX1 3 (do inglês <i>CBFA2/RUNX1 Partner Transcriptional Co-Repressor</i>)
CC	Circunferência da cintura
CD36	Molécula CD36 (do inglês <i>CD36 Molecule - Thrombospondin Receptor</i>)
CEP/CONEP	Comitês de Ética locais e nacionais
CV	Coeficiente de variação
DACH1	Fator de transcrição da família Dachshund 1 (do inglês <i>Dachshund Family Transcription Factor 1</i>)
DCV	Doenças cardiovasculares
DLL	Ligante Delta Like Notch canônico (do inglês <i>Delta Like Canonical Notch Ligand</i>)
DNLZ	Dedo de zinco tipo DNL (do inglês <i>DNL-Type Zinc Finger</i>)
DP	Desvio Padrão
ETV6	Fator de transcrição de variante ETS 6 (do inglês <i>ETS Variant Transcription Factor 6</i>)
eQTL	Expressão de <i>loci</i> de característica <i>quantitativa</i> (do inglês <i>Expression quantitative trait loci</i>)
fL	<i>Fentolitro</i>
FOXK2	(do inglês <i>Forkhead Box K2</i>)
GPJ	Glicose no plasma em jejum
GWAS	Sequenciamento Completo do Genoma (do inglês <i>Genome Wide Association</i>)
H3K4me1	Monometilação da lisina 4 na subunidade de proteína histona H3 (do inglês <i>Monomethylation of lysine 4 on histone H3 protein subunit</i>)
Hb1Ac	Hemoglobina glicada

HDL	Colesterol de lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>High-density lipoprotein</i>)
HsCRP	Proteína C reativa de alta sensibilidade (do inglês <i>High-sensitivity C-reactive protein</i>)
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg (do inglês <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>)
IC	Intervalo de Confiança
IMC	Índice de massa corporal
INDELS	Polimorfismos de inserção/deleção
INPP5E	Inositol Polifosfato-5-Fosfatase E (do inglês <i>Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E</i>)
JAG	Ligante Notch canônico irregular (do inglês <i>Jagged Canonical Notch Ligand</i>)
KDM4B	Lisina Desmetilase 4B (do inglês <i>Lysine Demethylase 4B</i>)
LDL	Colesterol de lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>Low-density lipoprotein</i>)
LMP2	Subunidade Proteassoma 20S Beta 9 (do inglês <i>Proteasome 20S Subunit Beta 9</i>)
LMP7	Subunidade Proteassoma 20S Beta 8 (do inglês <i>Proteasome 20S Subunit Beta 8</i>)
MAF	Frequência do Alelo Menor (do inglês <i>Minor Allele Frequency</i>)
miR	MicroRNA
MYC	MYC Proto-Oncogene, Fator de Transcrição BHLH (do inglês <i>MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor</i>)
NALT1	LncRNA Associado a <i>NOTCH1</i> em Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T 1 (do inglês <i>NOTCH1 Associated LncRNA In T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1</i>)
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NOTCH1	Receptor Notch 1 (do inglês <i>Notch Receptor 1</i>)
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica

PHF	Proteína de dedo PHD (do inglês <i>PHD Finger Protein</i>)
POL2	Subunidade catalítica da DNA polimerase II (do inglês <i>Catalytic subunit of DNA polymerase II</i>)
RHD	Retinol desidrogenase (do inglês <i>Retinol dehydrogenase</i>)
RBM4	Proteína Motivo de Ligação de RNA 4 (do inglês <i>RNA Binding Motif Protein 4</i>)
RBM14	Proteína Motivo de Ligação de RNA 14 (do inglês <i>RNA Binding Motif Protein 14</i>)
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>)
RFX1	Fator Regulatório X1 (do inglês <i>Regulatory Factor X1</i>)
SABE	Saúde, Bem Estar e Envelhecimento
SDCCAG3	Antígeno 3 de câncer de cólon definido sorologicamente (do inglês <i>Serologically defined colon cancer antigen 3</i>)
SEC16A	SEC16 Homólogo A (do inglês <i>SEC16 Homolog A</i>)
SNP	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SP3	Fator de transcrição Sp3 (do inglês <i>Sp3 Transcription Factor</i>)
sQTL	Splicing de loci de característica quantitativa (do inglês <i>Splicing Quantitative Trait Loci</i>)
SSC	Cromossomo de Porco (do inglês <i>Pig chromosome</i>)
TP53	Proteína Tumoral P53 (do inglês <i>Tumor Protein P53</i>)
VCM	Volume corpuscular médio
VPS13A	Classificação Vacuolar de Proteínas 13 Homólogo A (do inglês <i>Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog A</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
ZIC	Membro da Família Zic (do inglês <i>Zic Family Member</i>)
ZNF	Proteína dedo de zinco (do inglês <i>Zinc Finger Protein</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Histórico	18
1.2 Parâmetros para avaliação do RDW	19
1.3 A associação entre Envelhecimento, Doenças Crônicas, Mortalidade e RDW	19
1.4 Bases Genéticas do RDW	21
1.4.1 NOTCH1	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MÉTODOS	27
3.1 Coorte de Estudo	27
3.2 Coleta de dados	27
3.3 Seleção de Dados de Sequenciamento de Última Geração e Tag SNPs	29
3.4 Análise Estatística	29
3.5 Análise Funcional <i>In Silico</i>	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Caracterização da Coorte de Estudo	31
4.2 Associação de SNPs e RDW	32
4.3 Estrutura de Desequilíbrio de Ligação e Análise de Haplótipos	37
4.4 Análise Funcional <i>In Silico</i>	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	46
7 REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	59
APÊNDICE I	60
ANEXOS	61
ANEXO I – Ofício COEP SABE 1999	62
ANEXO II - Ofício COEP SABE 2006	63
ANEXO III - Ofício COEP SABE 2010	64
ANEXO IV - Parecer de aprovação SABE 2015	65

1 INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido conjuntivo constituído pelos glóbulos sanguíneos e plasma. Os glóbulos sanguíneos incluem as hemácias, também chamadas de eritrócitos ou glóbulos vermelhos, as plaquetas e os leucócitos. Ainda, o sangue realiza o transporte de oxigênio, nutrientes, remoção do dióxido de carbono, dentre outras funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2007).

O eritrograma avalia os eritrócitos quantitativamente e qualitativamente por meio da contagem do número total, medição da concentração de hemoglobina e cálculo do hematócrito, bem como os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês *Red Cell Distribution Width – RDW*) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2007).

1.1 Histórico

Desde a descoberta dos eritrócitos, por Antonie van Leeuwenhoek's, em 1674, diferentes estudos investigam a variação no tamanho desse tipo de célula sanguínea. Quanto maior a diferença de tamanho entre os eritrócitos, maior é o RDW.

Em 1910, o patologista britânico Cecil Price-Jones sugeriu a utilização do RDW para o diagnóstico em pacientes com anemia (PIERRE, 2002; CAPORAL; COMAR, 2013; HOFFMANN; URRECHAGA, 2020), pois a primeira evidência da deficiência de ferro no hemograma é o aumento desse parâmetro (GROTTO, 2010; HENNEBERG *et al.*, 2011). No entanto, a utilização do RDW na área laboratorial teve início apenas no fim da década de 70 (ROWAN *et al.*, 1979). Em 1980, Bessman *et al.* propuseram o diagnóstico da anemia com base nos valores do VCM e RDW, evidenciando uma importante correlação do RDW e outros marcadores.

Mais recentemente, o RDW foi apontado como biomarcador relacionado, principalmente, a DCV como aterosclerose e doença arterial coronariana (SU *et al.*, 2014), bem como câncer gástrico (YAZICI *et al.*, 2015), doença pulmonar intersticial (KATYAL; JANMEJA; KU, 2015), dentre outras doenças, podendo ser utilizado associado ou não aos marcadores convencionais (LIPPI; MATTIUZZI, 2015; LIPPI; PLEBANI, 2014).

1.2 Parâmetros para avaliação do RDW

Os eritrócitos podem ser classificados de acordo com a homogeneidade e heterogeneidade (BUTTARELLO; PLEBANI, 2008). Esta classificação pode ser obtida pelo coeficiente de variação (CV) do RDW ou do desvio padrão (DP) do RDW. O CV mais utilizado, sendo calculado pela equação: $RDW = \frac{L2-L1}{L2+L1}$, onde L1 refere-se ao CV um e L2 ao CV dois.

Os valores do CV são expressos em porcentagem, variando entre 10.7% e 12.9% (menores valores) e 13.8% e 15.3% (maiores valores), dependendo do analisador hematológico utilizado e consideram o VCM. Já o RDW obtido por DP é calculado pela média dos tamanhos dos eritrócitos distribuídos até 20% acima do histograma, pois a maior variabilidade está na base do histograma. Nesse caso, os resultados são expressos em fL, com valores de referência entre 38,6 e 49,1 fL. (NASCIMENTO, 2003).

De forma geral, compreender os altos valores de RDW é importante, pois podem estar relacionados a uma eritropoiese desequilibrada, regulada por fatores humorais como a eritropoietina, que desempenha um papel crucial na produção, maturação e sobrevivência de glóbulos vermelhos (FRIED, 2009; LIPPI *et al.*, 2006). No entanto, não existe um corte universal para definir altos níveis de RDW (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros para alto RDW de acordo com a literatura

Autor(es)	Ano	RDW	n	Faixa etária	País
Pilling, L. C <i>et al.</i>	2018	≥15%	6.050	40 a 70 anos	Reino Unido
Bain, B	2016	>15,5%	700	18 a 70 anos	
Chu, Y <i>et al.</i>	2017	≥15.4%	376	≥35 semanas de gestação	China
Sgnaolin <i>et al.</i>	2013	>15%	392	>60 anos	Brasil
Wang, B <i>et al.</i>	2018a	≥15.2%	14.078	>18 anos	Estados Unidos

Abreviaturas: RDW, *Red Cell Distribution Width*; n, número de indivíduos.

1.3 A associação entre Envelhecimento, Doenças Crônicas, Mortalidade e RDW

O envelhecimento provém da acumulação de danos moleculares e celulares ao longo do tempo, levando à diminuição da capacidade física e mental, sendo um fenômeno natural que representa múltiplos desafios para a ciência atual, pois está associado ao provável aumento da incidência de diversas doenças crônicas (*World Health Organization - WHO*, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a população idosa mundial dobrará nos próximos 35 anos (BEARD *et al.*, 2016) e o relatório *World Population Prospects 2019* revela que, entre 2019 e 2050, o número de idosos alcançará 1,5 bilhões de pessoas (UNITED NATIONS, 2019).

No Brasil, a população de idosos teve um aumento de 7,3 milhões entre 1980 e 2000, totalizando 14,5 milhões de idosos em 2000 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2005), ultrapassando 30,2 milhões em 2017 conforme a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018). Até 2025, o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2005).

Contudo, as taxas de declínio relacionadas ao envelhecimento são variadas, alterando a qualidade e expectativa de vida. Dessa forma, compreender os fatores genéticos associados ao envelhecimento é de fundamental importância (LOCKE *et al.*, 2015). O envelhecimento está relacionado ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, ao RDW (ALIS *et al.*, 2015; HOFFMANN; NABBE; VAN DEN BROEK, 2015; LIPPI; SALVAGNO; GUIDI, 2014), que se refere à variação no tamanho e forma dos eritrócitos, correspondendo ao grau de anisocitose.

O alto índice do RDW é um fator preditivo para o risco de doenças (PILLING *et al.*, 2017), incluindo doenças cardiovasculares (HORNE *et al.*, 2010; TONELLI *et al.*, 2008; TURCATO *et al.*, 2016), anemias e outras deficiências de ferro ou folato (INUZUKA; ABE, 2015), dislipidemia (LIPPI *et al.*, 2013), outras anormalidades metabólicas provenientes do envelhecimento (SHARMA; AGRAWAL, 2015). Ainda, evidências sugerem associação do RDW com obesidade, especialmente em adolescentes, biomarcadores de inflamação (FUJITA *et al.*, 2013), diabetes tipo 2 (KNYCHALA *et al.*, 2021) e pode ser útil para prever fibrose hepática e necroinflamação em pacientes com hepatite B (XU *et al.*, 2015). Mais recentemente foi verificado que o aumento do RDW ou a redução de linfócitos antes do diagnóstico também pode predizer pior prognóstico na COVID-19 (LORENTE *et al.*, 2021; WONG *et al.*, 2021).

O RDW é um biomarcador emergente de morbidade e mortalidade por todas as causas (PERLSTEIN *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2009), câncer, doenças cardiovasculares, respiratórias (PAN; BORNÉ; ENGSTRÖM, 2019) e mortalidade em

idosos com ou sem doenças relacionadas à idade (PATEL *et al.*, 2010). Contudo, sua associação com o risco de mortalidade em adultos mais jovens é pouco explorada. Neste sentido, Tajuddin *et al.* (2017) revela que o RDW está associado à mortalidade em adultos afro-americanos e brancos, sendo agravado pela obesidade.

O impacto da dieta, atividade física e estresse são fatores ambientais que influenciam a maquinaria molecular e celular (ROSA-GARRIDO; CHAPSKI; VONDRISKA, 2018). Nahrendorf e Swirski (2015) afirmam que o estilo de vida influencia a hematopoiese, assim, é possível que modulem indiretamente valores de RDW. Além disso, a concentração aumentada de ácido láctico, ou hiperlactacidemia, está envolvida na mudança da contagem de eritrócitos e aumento da anisocitose. De forma geral, essa associação ocorre por meio da produção rápida de eritrócitos e variações na sobrevivência destes (SALVAGNO *et al.*, 2015).

A análise do RDW junto a outros biomarcadores emergentes relacionados ao envelhecimento é importante para o diagnóstico ou prognóstico de doenças crônicas (PILLING *et al.*, 2017). Além disso, níveis elevados de RDW estão associados um aumento de 4,8 vezes no risco de mortalidade em 5 anos após o aumento da pressão diastólica (SENTHONG *et al.*, 2017).

1.4 Bases Genéticas do RDW

Estudos recentes mostram que é possível que fatores genéticos tenham um papel na variabilidade do RDW. Todavia, essa base genética ainda é pouco conhecida. Evans, Frazer e Martin (1999) revelam que fatores genéticos contribuem significativamente para traços de células sanguíneas, representando de 61 a 96% da variância. Diversas características hematológicas, incluindo hematócrito, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média e RDW, são semelhantes animais e humanos (CHEN *et al.*, 2011; QIU, 2009).

Liu *et al.* (2011) demonstraram que o RDW está associado a SNPs no gene LMP2/LMP7 em porcos e um estudo de GWAS em três gerações de cruzamento de javalis e porcas Minzhu revelou associação de dois SNPs, MARC0049315 e MARC0036181, na região de 26,0-26,2 Mb do gene SSC12 ao RDW (LUO *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2013) observaram a associação de três SNPs em SSC6 e RDW.

Mais de 80 regiões genômicas foram associadas a um ou mais traços de hemácias por meio de estudos de GWAS em populações de descendência europeia e, menos frequentemente, envolvendo ancestralidade asiática e africana (CHAMBERS *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013; GANESH *et al.*, 2009; KAMATANI *et al.*, 2010; KULLO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013; SORANZO *et al.*, 2009; VAN DER HARST *et al.*, 2012). Hinckley *et al.* (2013) demonstraram que o 10p12 (*GATA70E11*) é responsável por 26.67% da variação no RDW na população Amish.

Vale ressaltar que ainda não há dados na população brasileira. Fatumo *et al.* (2022) revelam que até 2021, 86% dos estudos genômicos tinham foco em indivíduos de ascendência europeia, taxa que, em 2016, era de 81%. Este fato é relevante, pois o estudo de variantes genéticas em diferentes populações permite a análise de SNPs menos comuns, que auxiliam a compreensão de mecanismos e possíveis alvos terapêuticos.

Segundo Chami *et al.* (2016), a variante *nonsense* rs3211938 no gene *CD36* está associada a alto RDW em afro-americanos e há evidências de associação em hispânicos. Ainda, os autores revelam associação de eQTL em rs10903129 e RDW além de *RHD* no sangue total e, em *VPS13A*, variantes *nonsense* estão associadas a maior RDW (PELOSO *et al.*, 2016).

Astle e colaboradores (2016) investigaram variantes associadas a características hematológicas, incluindo RDW, em bancos de dados do Reino Unido envolvendo participantes de ascendência europeia e dentre os SNPs associados, 33% estão relacionados exclusivamente a traços de hemácias.

Pilling *et al.* (2017), em seu estudo de GWAS no Reino Unido, verificaram que 29% do RDW é relacionado a variantes genéticas distribuídas em 141 loci, 139 SNPs anotados e 5 não anotados. Nesse estudo, o RDW está associado a 194 sinais genéticos independentes. Destes, 119 são intrônicos, 71 associados a doenças autoimunes, câncer, índice de massa corporal (IMC), doença de Alzheimer, longevidade, idade da menopausa, densidade óssea, miosite, doença de Parkinson e degeneração macular relacionada à idade. Ainda, variáveis como HDL, diabetes tipo 1 e síndrome metabólica estão significativamente associadas ao RDW, assim como doença de Crohn e doença inflamatória intestinal. Dentre os diversos genes e variantes, *NOTCH1* foi apresentado como associado ao RDW.

1.4.1 NOTCH1

O *NOTCH1* (OMIM: 190198) é um dos quatro genes conhecidos (*NOTCH1-4*) que pertencem à via Notch, que é evolutivamente conservada e atua em processos do desenvolvimento, incluindo diferenciação celular e apoptose. Sua proteína possui uma subunidade extracelular (NOTCH1-EC) que envolve, principalmente, múltiplas repetições do tipo fator de crescimento epidérmico (EGF) em sua porção N-terminal e o domínio LNR, que forma um complexo com os ligantes Jagged/Delta-like (Jagged1/2, Dll1/3/4) (BI; KUANG, 2015; BRAY, 2006; MATSUNO, 2020). Ainda, essa proteína possui uma subunidade intracelular que consiste nos domínios transmembranar (TMIC) e intracelular (ICD) (ROSATI *et al.*, 2018) (Figura 1).

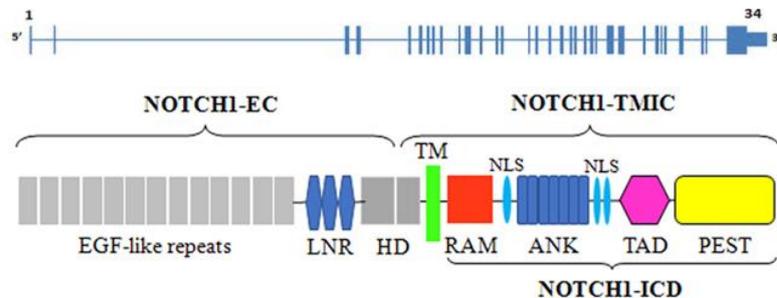


Figura 1 - Estrutura da proteína: subunidades e domínios em *NOTCH1*. Extraído de Rosati *et al.*, 2018.

A interação com esses ligantes resulta na clivagem no sítio S2 pela protease ADAM (BROU *et al.*, 2000; MUMM *et al.*, 2000) e clivagem transmembrana em S3 pelo complexo γ -secretase, gerando o domínio intracelular Notch (NICD) (SCHROETER; KISSLINGER; KOPAN, 1998; LECOURTOIS; SCHWEISGUTH, 1998). O NICD forma o complexo de ativação da transcrição com um fator de transcrição e um coativador transcricional, iniciando a transcrição (ZHANG *et al.*, 2016) (Figura 2).

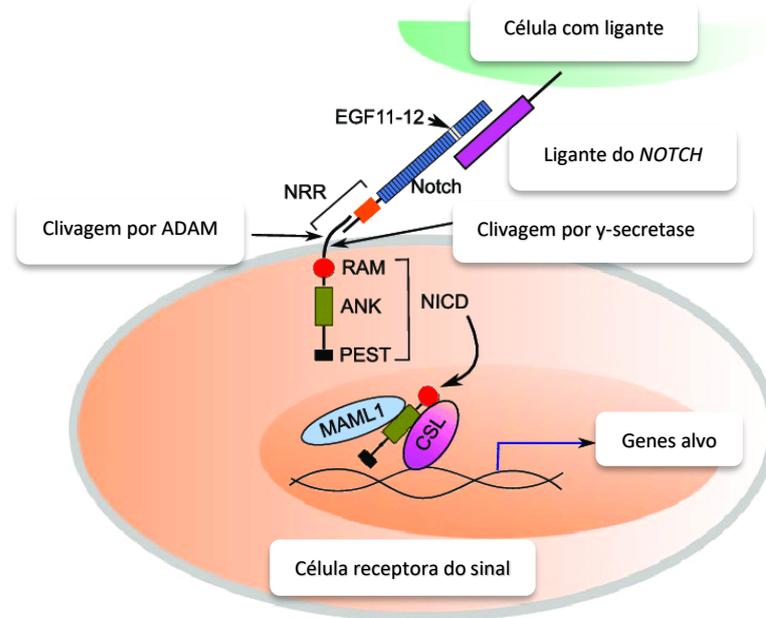


Figura 2 - Via de sinalização NOTCH enfatizando *NOTCH1*. Extraído e adaptado de: Zhang *et al.*, 2016.

O gene *NOTCH1*, também conhecido como *hN1*, *AOS5*, *TAN1* ou *AOVD1* e sua principal isoforma é a *neurogenic locus notch homolog protein 1 isoform X1* (NCBI, 2022a). Este gene está localizado na região 9q34 (Figura 3), é composto por 34 éxons.

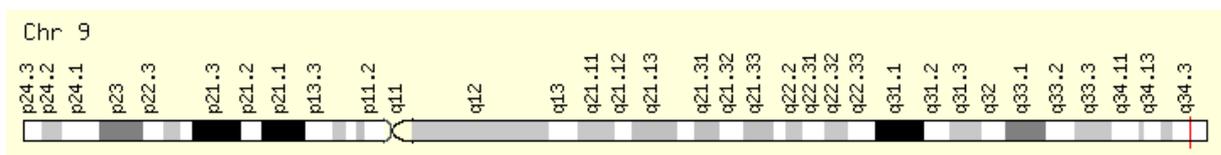


Figura 3 - Localização genômica do *NOTCH1*. Extraído de: GeneCards, 2022.

O *NOTCH1* é expresso em células-tronco e em diversos tecidos, incluindo o sangue. Mutações em *NOTCH1* causam síndrome de Adams-Oliver (OMIM: 616028), doença da válvula aórtica (OMIM: 109730) (OMIM, 2022), queratoacantoma (MCID: KRT005) e tetralogia de Fallot (MCID: TTR001) (MALACARDS, 2022). Devido à grande importância deste gene, SNPs nesse gene podem indicar diferenças em nossa suscetibilidade a diversas doenças (CAO *et al.*, 2014; QUAN *et al.*, 2017).

Neste sentido, SNPs em *NOTCH1* estão associados a malformações cardiovasculares (PILEGGI *et al.*, 2019), condições de estresse (STEINE *et al.*, 2016), suscetibilidade a doenças de estilo de vida (DING *et al.*, 2018), câncer (SHAH *et al.*,

2020) e condições hematológicas. No Catálogo GWAS o *NOTCH1* é associado a diversos parâmetros hematológicos, incluindo hemoglobina corpuscular média, contagem de eosinófilos e RDW.

Com base nas evidências acima, hipotetizamos que variantes genéticas em *NOTCH1* estão associadas ao RDW, um importante marcador de doenças crônicas e envelhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Verificar se variantes em *NOTCH1* estão associadas ao RDW.

2.2 Objetivos Específicos

- Validar a associação entre o RDW e o SNP rs3124592 em *NOTCH1*;
- Identificar novas variantes importantes na população brasileira;
- Identificar haplótipos associados a altos níveis de RDW.

3 MÉTODOS

3.1 Coorte de Estudo

A amostra foi constituída por 1105 participantes de uma coorte denominada SABE (Saúde, Bem Estar e Envelhecimento), idealizada pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS). O SABE foi uma pesquisa multicêntrica que avaliou idosos em sete centros urbanos do Caribe e da América Latina, incluindo São Paulo - Brasil. Este estudo 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, número de protocolo 2015/12837/1.015.223) (ANEXOS I, II, III e IV) e os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo CEP/CONEP (Comitês de Ética locais e nacionais) (BRIDE *et al.*, 2021; NASLAVSKY *et al.*, 2017).

3.2 Coleta de dados

Entrevistas foram conduzidas com os participantes utilizando um questionário padronizado pela OPAS (C10, traduzido, adaptado e validado), que teve como foco obter dados da história médica, estilo de vida e características sociodemográficas. Todos os participantes foram submetidos a coletas de sangue para análises bioquímicas e genômicas.

As seguintes variáveis foram avaliadas: sexo, idade, glicemia em jejum (GPJ) (mg/dL), hemoglobina glicada (Hb1Ac) (%), colesterol total (CT) (mg/dL), triglicerídeos (TG) (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), proteína C reativa (hsCRP) (mg/l), pressão arterial sistólica (PAS) (mmHg), pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg), IMC (kg/m²), Circunferência da Cintura (CC) (cm), incidência de acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão, diabetes, DCV, déficit cognitivo, hiperlipidemia, contagem dos glóbulos vermelhos, leucócitos, plaquetas e RDW, bem como albumina, glicose, ácido úrico e creatinina.

O histórico de eventos cardiovasculares (doença congestiva, doença coronariana ou infarto, AVC e hipertensão) foi autorreferido. A hipertensão, definida pela resposta à questão por meio da questão “Alguma vez algum médico ou enfermeira disse que o(a) Sr(a) teve a pressão alta no sangue?”, elevação sustentada dos níveis pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg na 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (MALACHIAS *et al.*, 2016). No entanto, esta doença foi considerada em uma categoria distinta. O AVC

foi autorreferido por meio da questão “Alguma vez algum médico ou enfermeira disse que o(a) Sr(a) teve um derrame ou isquemia cerebral (também chamado embolia) ou AVC? (Incluir aneurisma)”.

No que se refere à antropometria, o peso foi medido em balança portátil e a estatura em antropômetro. O IMC é definido é definido pelos quilos (kg) do indivíduo divididos pelo quadrado da sua altura (m). WHO adota o $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ como parâmetro para definição da obesidade. Por fim, a circunferência da cintura foi medida com uma fita de medição inelástica no ponto médio entre a margem inferior da última costela palpável e o topo da crista ilíaca com valores alterados definidos como (Homens: ≥ 102 cm e Mulheres: ≥ 88 cm) pela Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da Síndrome Metabólica (2005) (ALBERTI *et al.*, 2009).

O Lipidograma foi analisado segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, sendo alterados valores de CT ≥ 190 mg/dl, TG ≥ 150 mg/dL, HDL e LDL conforme o nível de risco (FALUDI *et al.*, 2017).

O diagnóstico da diabetes foi baseado na resposta à pergunta "Alguma vez um médico ou enfermeiro lhe disse que o(a) Sr(a) tem diabetes, quer dizer, níveis altos de açúcar no sangue?", uso de medicação anti-diabética, glicose plasmática de jejum ≥ 126 mg/dl e Hb1Ac $>6.5\%$, conforme a Sociedade Brasileira de Diabetes e WHO.

A hsCRP foi quantificada por meio de um imunoensaio. Segundo a literatura, seus parâmetros compreendem: menos de 0,3 mg/dL - normal; 0,3 a 1,0 mg/dL - Elevação normal ou menor (relatada na obesidade, diabetes, sedentarismo, tabagismo e polimorfismos genéticos); 1,0 a 10,0 mg/dL - elevação moderada (inflamação sistêmica); mais de 10,0 mg/dL - elevação acentuada; mais de 50,0 mg/dL - Elevação grave (NEHRING; GOYAL; PATEL, 2022).

Dessa coorte, composta por 1105 indivíduos, excluimos todos os indivíduos que não possuíam informação sobre RDW e sexo indefinido. Devido à falta de consenso quanto ao ponto de corte do RDW na literatura, optamos por um valor de corte de 15%, que corresponde aproximadamente ao percentil 90 em nossa população de estudo, bem como aos parâmetros estabelecidos em laboratórios, principalmente devido à tecnologia de *Cell Dyn 4000* e demais equipamentos similares (FAILACE, 2018). Além disso, este valor é utilizado em uma das categorias de Pilling *et al.* (2017) e, segundo os autores, está associado ao alto risco de doenças e mortalidade. Além

disso, o valor foi definido também com base no estudo de Sgnaolin *et al.* (2013), que investigou a relação da anemia e parâmetros hematológicos em uma população idosa no Brasil. Assim, os participantes foram estratificados em casos ($RDW \geq 15\%$) e controles ($RDW < 15\%$).

3.3 Seleção de Dados de Sequenciamento de Última Geração e Tag SNPs

A extração de DNA, o sequenciamento do genoma completo (*Illumina HiSeq Sequencer*) e o controle de qualidade das variantes foram descritos em Naslavsky *et al.* (2020).

As variantes e frequências alélicas depositadas no ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações (Arquivo Online de Mutações Brasileiras, <http://abraom.ib.usp.br>) foram utilizadas. Usamos as ascendências individuais: europeia, africana, nativa americana e do leste asiático inferidas por Naslavsky *et al.* (2020) como covariáveis. Além disso, foram filtrados SNPs localizados nas posições inicial e final de *NOTCH1* mais 50-Kb em ambos os lados, abrangendo Chr9:136.440.101 a 136.599.978 da sequência de referência humana (GRCh38:NC_000009.12), incluindo as regiões de borda, contendo os genes *SEC16A*, *C9orf163* e *NALT1*. Após a exclusão dos INDELS, foram filtrados os SNPs com Frequência do Alelo Menor (MAF) maior ou igual a 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 marcação pareada realizado com limite de $r^2 \geq 0.8$) usando dados de genótipo HapMap (versão 28) no software Haploview 4.2 (BARRETT *et al.*, 2005). Os Tag SNPs foram incluídos na análise de associação. As frequências dos alelos e genótipos de SNPs associados foram comparadas com as do projeto *Allele Frequency Aggregator* (ALFA) do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (PHAN *et al.*, 2020).

3.4 Análise Estatística

As características dos indivíduos foram comparadas por meio de estatística descritiva. Variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e porcentagens, N(%), e as variáveis contínuas foram como medianas e valores extremos (mínimo e máximo) para dados não paramétricos. Nós utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição.

As comparações entre indivíduos com RDW normal e alterado foram realizadas por meio dos testes de qui-quadrado e Mann-Whitney. A análise de associação baseada em SNP foi realizada usando o pacote R “*SNPassoc*”, sob diferentes modelos genéticos (codominante, dominante, recessivo, superdominante e log-aditivo) (GONZÁLEZ *et al.*, 2007) A análise foi ajustada para idade, sexo e ancestralidade (Modelo 1), bem como as demais variáveis de confusão (Modelo 2). Odds ratio (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 (BARRETT *et al.*, 2005). As frequências de haplótipos foram estimadas pelo algoritmo Expectation – Maximization (algoritmo EM) usando o pacote estatístico R “HaploStats” (SCHAID *et al.*, 2002).

Foi adotada a significância de $p < 0,05$ e correção de Bonferroni para comparações de múltiplos testes ($P = 0,05/N$ SNPs ou haplótipos testados). A análise estatística foi realizada utilizando o SPSS versão 27.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) e o ambiente computacional R versão 4.0.0 (R Development Core Team, 2020).

3.5 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 *GTEX Portal* (ARDLIE *et al.*, 2015) O banco de dados *rVarBase* (versão 2.0 do *rSNPBase*) foi usado para descrever as características regulatórias do SNP em relação aos estados de cromatina, elementos reguladores sobrepostos e potenciais genes-alvo.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Coorte de Estudo

Foram incluídos 1097 participantes da coorte SABE, dos quais 134 apresentaram RDW \geq 15%. A caracterização da amostra está na tabela 2.

Tabela 2 - Características clínicas, antropométricas, sociodemográficas e de ancestralidade da coorte SABE

Variáveis	Todos os indivíduos	Casos	Controles	Valor de p
<i>N</i>	1097	134(12.22%)	963(87.78%)	—
Mediana do RDW (%)	13.8	15.65	13.7	
Masculino (%)	394(35.92%)	39(29.1%)	355(36.79%)	0.097
Feminino (%)	703(64.08%)	95(70.9%)	608(6.22%)	0.097
Idade (anos)	71.69(59-100)	76.35(60-95)	70.96(59-100)	<0.001
<i>Frequência das ancestralidades</i>				
Europeia	72.65%	71.05%	72.88%	<0.001
Africana	17.88%	20.65%	17.49%	<0.001
Asiática	2.80%	1.49%	2.98%	<0.001
Nativa Americana	6.67%	68.12%	66.47%	<0.001
Contagem de Eritrócitos	4.8(2.5-6.2)	4.7(2.5-6.1)	4.8(2.8-6.2)	0.63
Hemoglobina	14.1(4.6-19.2)	13(8.4-17)	14.2(4.6-19.2)	<0.001
PAS (mmHg)	138(88-250)	137.5(89-194)	138(88-250)	0.828
PAD (mmHg)	79(49-125)	76(50-123)	79(49-125)	0.012
Hipertensão (%)	754(68.73%)	98(73.13%)	656(68.12%)	0.276
DCV	254(23.15%)	49(36.57%)	205(21.29%)	<0.001
AVC	91(8.3%)	18(13.43%)	73(7.6%)	0.032
DT2 (%)	271 (24.66%)	39(29.10%)	232(24.09%)	0.226
GPJ (mg/dl)	88(20-437)	87(23-251)	88(20-437)	0.135
Hb1Ac (%)	5.8(4.8-13.7)	5.9(4.9-11)	5.8(4.8-13.7)	0.003
hsCRP (mg/L)	2.28(0.14-141)	3.13(0.24-141)	2.24(0.14-80.5)	0.002
CT (mg/dl)	203(86-388)	191.5(89-321)	204(86-388)	0.006
TG (mg/dl)	115(25-1283)	113(38-528)	115(25-1283)	0.214
HDL (mg/dl)	48(19-133)	49.5(22-124)	48(19-133)	0.635
LDL (mg/dl)	125(28-299)	116.5(41-235)	126(28-299)	<0.001
IMC (kg/m ²)	27.45(15.13-53.61)	28.40(15.44-45.24)	27.44(15.13-53.61)	0.162
CC (cm)	94(62-142)	94(65-138)	94(62-142)	0.283

Os resultados foram apresentados como medianas e valores extremos (mínimo e máximo). Os valores de p indicam diferenças entre os indivíduos casos (RDW \geq 15%) e controles (RDW<15%) de acordo com o teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas quantitativas e o teste Qui-quadrado para variáveis qualitativas. As frequências de ancestralidade foram expressas como porcentagem dos valores médios. Abreviaturas: N, número de indivíduos; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; DCV, doença cardiovascular; AVC, acidente vascular cerebral; DT2, diabetes tipo 2; GPJ, glicose no plasma em jejum, HbA1c, hemoglobina glicada; hsCRP, proteína C reativa de alta sensibilidade; CT, colesterol total; TG, triglicerídeos; HDL, colesterol de lipoproteína de alta densidade; LDL, colesterol de lipoproteína de baixa densidade; IMC, índice de massa corporal; CC, Circunferência da Cintura.

Casos e controles diferiram significativamente nas variáveis: hemoglobina, idade, ancestralidade, câncer, doenças cardiovasculares (DCV), acidente vascular cerebral (AVC), pressão arterial diastólica (PAD), colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total (CT), hemoglobina glicada (HbA1c) e proteína C reativa (hsCRP).

4.2 Associação de SNPs e RDW

Foram encontradas 5599 variantes, mas apenas 4549 passaram pelo filtro de qualidade. Após a exclusão de In/Dels, restaram 3852 SNPs e excluindo os não anotados, 3816. Dessas, 566 apresentaram $MAF > 1\%$ e 226 são tags SNPs.

O rs3124592, do Catálogo GWAS (PILLING *et al.*, 2017) não foi associado em nossa coorte, mesmo após ajustes. Após ajuste para idade, gênero e ancestralidade (Modelo 1) e considerando a correção de Bonferroni ($0.05/226$) (Figura 4), a análise mostra a associação dos SNPs rs9411206 no modelo log-aditivo ($p = 0.0001477$). No modelo recessivo, as variantes rs2229971 ($p = 0.0001673$), rs9411207 ($p = 0.0002309$) e rs11574891 ($p = 0.0002440$) estão associadas (Tabela 3). Considerando que os genótipos diferem em relação à ancestralidade e variáveis clínicas, realizamos uma regressão logística multinomial.

Após o ajuste para todas as variáveis de confusão (Modelo 2: idade, gênero, ancestralidade, PAD, Hb1Ac, LDL, hsCRP, hemoglobina e AVC), os mesmos SNPs permaneceram associados, exceto o rs9411206 (Figura 5). O rs2229971 no modelo codominante ($p = 0.0002459$) e recessivo ($p = 0.00006304$); rs9411207 no modelo codominante ($p = 0.0002205$) e recessivo ($p = 0.00007347$) e rs11574891 no modelo codominante ($p = 0.0001395$) e recessivo ($p = 0.00002759$). Ainda, o rs9411206 ($p = 0.0004790930$) e o rs3124600 ($p = 0.0007613332$) estão marginalmente associados no modelo dominante e o rs9411206 no modelo aditivo ($p = 0.000461617$).

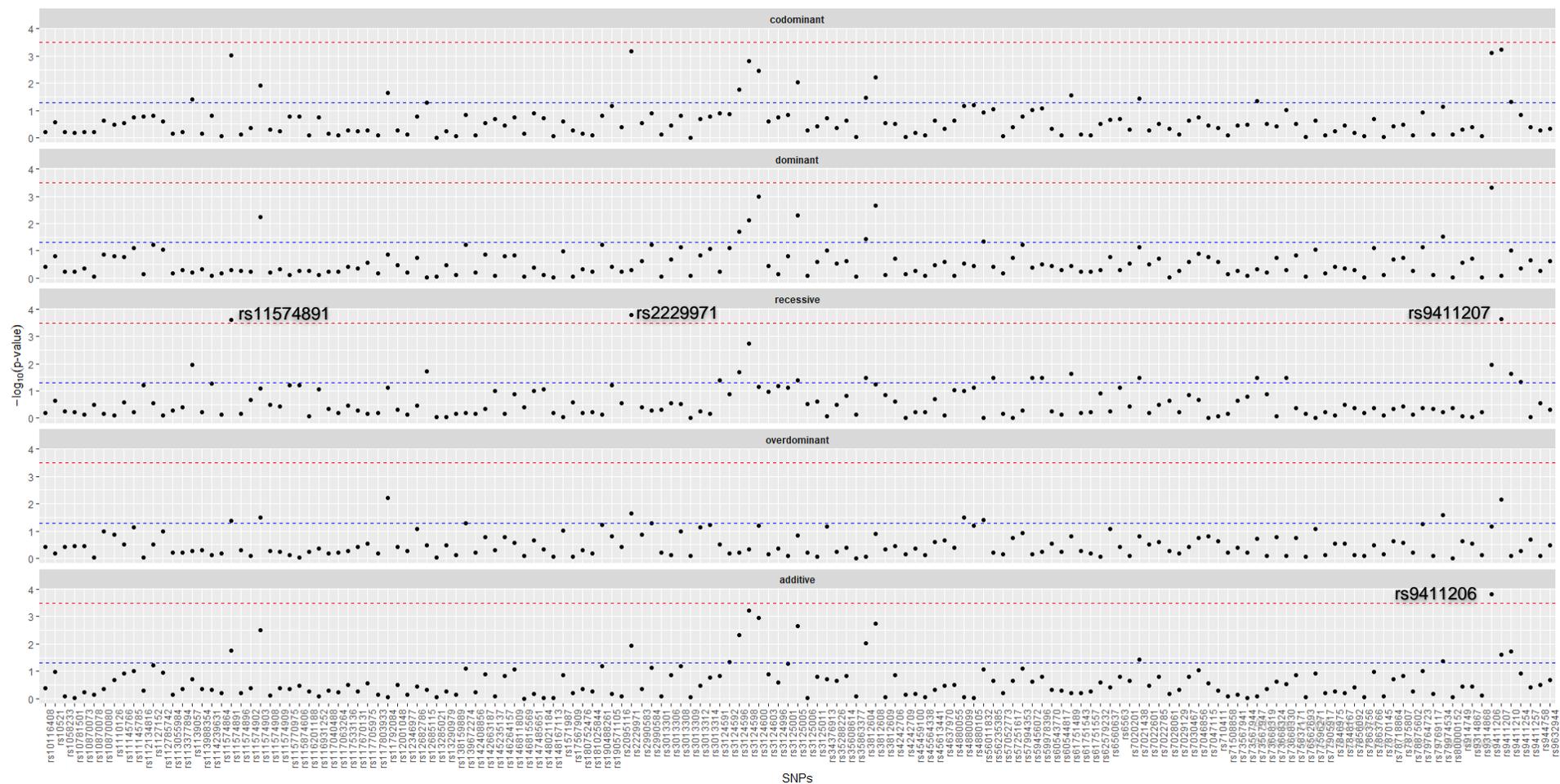


Figura 4 - Modelo 1. A linha vermelha representa a correção de Bonferroni e a azul o p-nominal.

Tabela 3 - Análise de associação de acordo com diferentes modelos genéticos

SNP	Controles	Casos	Modelo 1	OR (95% IC)	Valor de p	Controles	Casos	Modelo 2	OR (95% IC)	Valor de p
rs9411206										
GG	392(40.7%)	77(57.5%)	Codominante	0.57(0.38-0.85)	0.0007450	363(40.8%)	72(60%)	Codominante	0.50(0.32-0.79)	0.0016796
AG	434(45.1%)	48(35.8%)	Codominante	0.33(0.16-0.68)		399(44.9%)	39(32.5%)	Codominante	0.37(0.17-0.81)	
AA	136(14.1%)	9(6.7%)	Dominante	0.51(0.35-0.75)	0.0004982	127(14.3%)	9(7.5%)	Dominante	0.47(0.31-0.72)	0.0004791
			Recessivo	0.43(0.21-0.88)	0.0107207			Recessivo	0.51(0.24-1.08)	0.0604501
			Superdominante	0.70(0.48-1.03)	0.0695324			Superdominante	0.60(0.39-0.93)	0.0203584
			Log-aditivo	0.57(0.42-0.77)	0.0001477			Log-aditivo	0.56(0.40-0.79)	0.0004616
rs2229971										
AA	376(39.1%)	48(35.8%)	Codominante	0.85(0.56-1.31)	0.0006473	349(39.3%)	41(34.2%)	Codominante	0.82(0.51-1.34)	0.0002459
AG	447(46.5%)	49(36.6%)	Codominante	2.22(1.35-3.67)		410(46.2%)	44(36.7%)	Codominante	2.51(1.45-4.37)	
GG	138(14.4%)	37(27.6%)	Dominante	1.14(0.77-1.68)	0.5160675	129(14.5%)	35(29.2%)	Dominante	1.16(0.75-1.80)	0.4933
			Recessivo	2.43(1.56-3.78)	0.0001673			Recessivo	2.80(1.72-4.55)	0.00006304
			Superdominante	0.65(0.44-0.95)	0.0231762			Superdominante	0.59(0.39-0.90)	0.01316
			Log-aditivo	1.41(1.08-1.84)	0.0112893			Log-aditivo	1.51(1.12-2.02)	0.006586
rs9411207										
CC	345(35.9%)	46(34.3%)	Codominante	0.77(0.50-1.19)	0.0005707	318(35.8%)	39(32.5%)	Codominante	0.77(0.47-1.25)	0.0002205

SNP	Controles	Casos	Modelo 1	OR (95% IC)	Valor de p	Controles	Casos	Modelo 2	OR (95% IC)	Valor de p	
rs11574891	CT	462(48%)	49(36.6%)	Codominante	2.00(1.23-3.26)		425(47.8%)	44(36.7%)	Codominante	2.32(1.35-3.98)	
	TT	155(16.1%)	39(29.1%)	Dominante	1.05(0.71-1.55)	0.8154806	146(16.4%)	37(30.8%)	Dominante	1.11(0.72-1.71)	0.6464
				Recessivo	2.31(1.50-3.55)	0.0002309			Recessivo	2.69(1.37-4.32)	0.00007347
				Superdominante	0.60(0.41-0.87)	0.0068134			Superdominante	0.55(0.36-0.85)	0.005568
				Log-aditivo	1.35(1.04-1.76)	0.0246524			Log-aditivo	1.47(1.10-1.97)	0.009804
rs11574891	GG	428(44.5%)	54(40.3%)	Codominante	0.86(0.56-1.30)	0.0009143	391(44%)	44(36.7%)	Codominante	0.90(0.57-1.44)	0.0001395
	GA	433(45%)	49(36.6%)	Codominante	2.30(1.39-3.80)		403(45.3%)	47(39.2%)	Codominante	2.96(1.69-5.19)	
	AA	101(10.5%)	31(23.1%)	Dominante	1.13(0.78-1.64)	0.5253212	95(10.7%)	29(24.2%)	Dominante	1.26(0.82-1.92)	0.2851
				Recessivo	2.48(1.56-3.94)	0.0002440			Recessivo	3.12(1.88-5.18)	0.00002759
				Superdominante	0.68(0.46-0.99)	0.0433585			Superdominante	0.66(0.43-1.00)	0.04589
			Log-aditivo	1.38(1.06-1.80)	0.0178776			Log-aditivo	1.57(1.17-2.12)	0.002815	

Abreviaturas: SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confiança.

O projeto ALFA do banco de dados NCBI aponta um MAF de 45.06%, 52.05%, 32.80%, 27.71% e 34.65% para os SNPs rs3124592, rs9411206, rs2229971, rs9411207 e rs11574891, respectivamente (PHAN *et al.*, 2020). Além disso, analisando a frequência do alelo referência em diferentes projetos genômicos, percebe-se que as frequências de todos os SNPs foram diferentes em nossa população se comparada ao *1000Genomes* e, principalmente, ao *Vietnamese*, que possui as menores frequências dentre os projetos analisados (Tabela Suplementar 1).

4.3 Estrutura de Desequilíbrio de Ligação e Análise de Haplótipos

Os SNPs rs9411207 e rs11574891 estão localizados no íntron 13, éxons de borda 13 e 14; o rs9411206 no íntron 16 com éxons de borda 16 e 17; e o rs2229971 no éxon 14. Todos estão localizados na região correspondente ao domínio *EGF like*.

O rs9411207 apresentou alto desequilíbrio de ligação com rs2229971 ($D' = 0.934$) e rs11574891 ($D' = 0.998$) e o rs9411206 apresentou desequilíbrio de ligação com rs2229971 ($D' = 0.902$) (Figura 6). Por isso, investigamos o efeito da associação combinada desses SNPs em uma análise de haplótipos. Considerando todos os possíveis haplótipos contendo esses SNPs, 8 foram identificados em nossa coorte. No entanto, os haplótipos AGAT (1.17%), AGGT (0.12%) e GGGC (1.41%) foram classificados como raros. Assim, a tabela 4 apresenta apenas os haplótipos base e de efeito. O haplótipo 5 é mais presente em casos (37.05%) do que em controles (27.89%) e apresenta maior risco ($OR = 2.02$; $p = 0.018$). Além disso, nossas análises revelam que a OR diminui na ausência do rs9411206, demonstrando o potencial risco relacionado a este SNP.

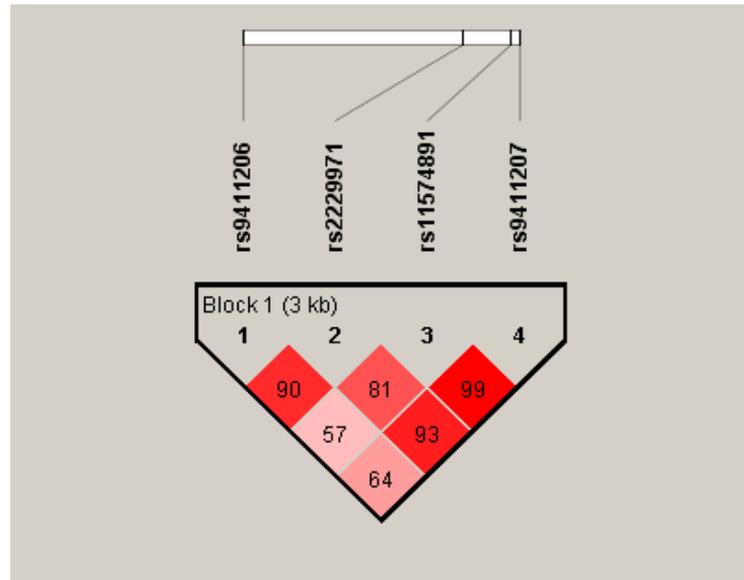


Figura 6 - Bloco Haplotípico rs9411206_rs2229971_rs11574891_rs9411207

Tabela 4 - Haplótipos mais comuns com base nos SNPs rs9411206_rs2229971_rs11574891_rs9411207

n	rs9411206	rs2229971	rs11574891	rs9411207	Todos os Indivíduos	Controles	Casos	OR(IC)	Valor de p
1	A	A	G	C	30.09%	31.51%	20.26%	1	-
2	A	A	A	T	3.76%	38.59%	30.11%	1.22(0.56-2.69)	0.4846
3	G	G	G	T	6.90%	7.03%	5.97%	1.36(0.78-2.38)	0.5456
4	G	A	G	C	27.43%	26.90%	30.83%	1.75(1.21-2.53)	0.1867
5	G	G	A	T	29%	27.89%	37.05%	2.02(1.42-2.86)	0.0018

Abreviaturas: n, número de indivíduos; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confiança.

4.4 Análise Funcional *In Silico*

Segundo o *GTEX Portal*, o *NOTCH1* é expresso em diversos tecidos, incluindo adiposo subcutâneo e visceral, mamário, cérebro, pulmão, artérias, coração, sangue, dentre outros. Por sua ampla expressão, variantes desse gene podem estar relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças.

O rs9411206 altera fatores de transcrição de genes em diferentes tecidos e é significativamente expresso em *Expression quantitative trait loci* (eQTLs), em ordem decrescente, *SEC16A* no sangue, *INPP5E* e *DNLZ* na tireoide, *SEC16A* no pâncreas, *SDCCAG3* no tecido adiposo subcutâneo, testículos (*INPP5E*); artéria tibial (*DNLZ*); e

DNLZ na musculatura esquelética. Ainda, esse SNP está associado a *Splicing Quantitative Trait Loci* (sQTLs): *INPP5E* no nervo tibial e no músculo esquelético; *SEC16A* no ventrículo esquerdo; *INPP5E* na artéria tibial, musculatura do esôfago e testículos. Para os demais SNPs, o portal não apresentou resultados.

Além disso, os rs9411206 e rs2229971 têm uma pontuação *Regulome DB* de 4, o rs9411207 de 3a e o rs11574891 de 2b, indicando seu potencial de afetar os níveis de expressão gênica. Nesse banco, os achados com a pontuação mais próxima de 1 tendem a ter maior potencial regulatório. Os SNPs associados interagem com fatores de transcrição no sangue: rs9411206 (*RBM14* e *RBM14-RBM4*); rs2229971 (*GM12878*); rs11574891 (*RFX1*) e com o motivo *SP3*; rs9411207 (*RFX1*), interage com os motivos *ZIC1*, 2 e 3. Já o marginalmente associado, rs3124600, têm uma pontuação de 2c e interage com 82 fatores de transcrição no sangue e com o motivo *MAX*. Além disso, esse SNP possui score 1, demonstrando o alto potencial regulatório da variante.

O banco de dados *HaploReg* destacou que a expressão desses SNPs está associada a funções similares. De acordo com dados presentes no *Haploreg*, todos estão associados a *enhancers* no pulmão, ventrículo direito, cérebro e baço, bem como modificações epigenéticas da proteína histona H3K4me1 no cérebro e pâncreas. Apenas os rs2229971 e rs9411207 estão relacionados a modificações do H3K4me1 no pulmão e baço. Os rs2229971 e rs11574891 também envolvem a modificação dessa estrutura no músculo esquelético.

O *rVarBase* afirma que os rs2229971, rs9411207, rs11574891 interagem com *NOTCH1*, *AGPAT2*, *C9orf163*, *NALT1* e os microRNAs miR4673 e miR4674, ambos originados da sequência do gene *NOTCH1*. Exceto o rs9411206, que interage apenas com *C9orf163*. Além disso, esses SNPs estão localizados na região interativa da cromatina com função de transcrição fraca, transcrição forte, *enhancers* gênicos, *enhancers* e *Zinc Finger Protein (ZNF)*, este último não está presente em rs9411206. Ainda, o rs2229971 está associado à abundância de RNAm e à proteína POL2.

A Tabela 5 é constituída de dados do *rVarBase* e *Haploreg*.

Tabela 5 - Análise *in silico* dos SNPs nos bancos *rVarBase* e *Haploreg*

SNP	Posição (hg38)	Ref>Alt	Consequência funcional
rs9411206	136511049	A>G, C, T	Intrônica
rs2229971	136513480	A>G	Sinônima
rs9411207	136514099	C>T, A, G	Intrônica
rs11574891	136514017	G>A	Intrônica

Abreviaturas: SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*; Ref, Alelo Referência; Alt, Alelo Alterado.

5 DISCUSSÃO

Segundo Patel *et al.* (2010), a taxa de renovação dos eritrócitos é estável em indivíduos saudáveis e diminui progressivamente à medida do envelhecimento. Quando ocorre o *turnover* eritrocitário, as células menores continuam circulando, resultando no aumento do RDW. Há algumas décadas foi visto que o aumento do RDW está associado a telômeros mais curtos em leucócitos (HASTIE *et al.*, 1990; KOZLITINA; GARCIA, 2012) e seu comprimento está relacionado ao envelhecimento celular e à senescência (LÓPEZ *et al.* 2013), além de fatores de risco de doenças (FYHRQUIST; SAIJONMAA apud BONDY, S. C.; CAMPBELL, 2016). Esse resultado foi visto em nosso trabalho e está de acordo com estudos recentes demonstram a associação entre RDW e idade (HOFFMANN; NABBE; VAN DEN BROEK, 2015), como apresentado em nosso estudo. Como mostrado, nossa amostra é composta de pacientes idosos, o que pode justificar a presença de diabetes (24.66%) e doenças cardiovasculares como AVC (8.3%) e hipertensão (68.73%).

Dentre os parâmetros possivelmente relacionados à variação do RDW, destaca-se o gênero, no entanto, os dados ainda são controversos. Pesquisas revelam que mulheres possuem um valor de RDW mediano mais alto em comparação aos homens, 13.8% e 13.3%, respectivamente (LIPPI; SALVAGNO; GUIDI, 2014). No entanto, outras investigações demonstraram que não há relação entre RDW e gênero (ABRAHAN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2010; QIAO *et al.*, 2014; BORNE *et al.*, 2014), semelhante a nossos resultados. Esta discrepância pode estar relacionada a variantes genéticas e epigenéticas (TAMNEN; FRISO; CHOI, 2013; FAIRFAX; KNIGHT, 2014).

O RDW atua como biomarcador para diversas doenças crônicas devido à inflamação decorrente de sua elevação. Nossos dados mostram que maiores valores de RDW estão associados à hsCRP, um marcador de inflamação sistêmica (KUSHNER *et al.*, 1982), sugerindo mau prognóstico (LI *et al.*, 2017; RANZANI *et al.*, 2013). Além disso, altos valores de RDW foram encontrados em pacientes com diabetes tipo 2 (KNYCHALA *et al.*, 2021) e estão relacionados à cetoacidose (ATALAIA *et al.*, 2018). Estes resultados podem justificar a associação entre Hb1Ac e RDW em nossa coorte, reforçados por evidências de que parte da variabilidade glicêmica apresenta correlações com estresse oxidativo e estabilidade da membrana eritrocitária (RODRIGUES *et al.*, 2018).

O RDW é um fator preditivo de mortalidade, fração de ejeção do ventrículo esquerdo, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, infarto do miocárdio, doença pulmonar obstrutiva crônica e síndrome coronariana aguda (HORNE *et al.*, 2010; TONELLI *et al.*, 2008). É importante ressaltar que o RDW está correlacionado à estabilidade da membrana eritrocitária que é mais sensível ao LDL (BERNARDINO NETO *et al.*, 2013) e níveis elevados de RDW foram preditores de alta pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, bem como a um aumento de 4,8 vezes no risco de mortalidade em 5 anos (SENTHONG *et al.*, 2017). Ainda, variantes intrônicas raras em alto desequilíbrio de ligação no gene *NOTCH1* estão associadas a defeitos obstrutivos da via de saída do ventrículo esquerdo entre indivíduos de ascendência europeia (HELLE *et al.*, 2018).

O RDW pode estar relacionado à aterosclerose carotídea (FENG *et al.*, 2017). Garrote-Filho, Bernardino Neto e Silva (2017) demonstram que o colesterol presente na membrana dos eritrócitos está relacionado ao crescimento da placa de ateroma e o aumento do RDW pode prever o agravamento da aterosclerose. A alteração do RDW pode estar relacionada à embolia cerebral e AVC (FENG *et al.*, 2017). No entanto, o mecanismo biológico envolvendo RDW e AVC ainda não é elucidado e a inflamação e o estresse oxidativo ocasionados pelo aumento desse fator podem desempenhar um papel nos tipos isquêmico e criptogênico, além de atuar enquanto marcador diagnóstico (DABBAH *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2017; VAYÁ *et al.*, 2014). Ainda, o RDW >14% aumentou o risco de AVC criptogênico em 2,5 vezes (VAYÁ *et al.*, 2014). Essas evidências justificam a inclusão do AVC no modelo de regressão 2 e corrobora as associações com DCV e AVC descritas na presente análise.

Em geral, o estudo do RDW apresenta várias vantagens sobre os biomarcadores convencionais, pois possui baixa variação biológica intraindividual, facilidade de interpretação, ampla disponibilidade (PILLING *et al.*, 2017) e baixo custo (FAVA *et al.*, 2019).

No entanto, a base genética do RDW ainda é pouco esclarecida. A ancestralidade ameríndia ainda é pouco explorada, assim como a população latina. Neste sentido, o estudo de GWAS realizado por Hodonsky *et al.* (2017) investigou traços quantitativos de parâmetros hematológicos em indivíduos hispânicos e identificou 8 regiões genômicas associadas ao RDW. É importante destacar que a população latina é

eticamente heterogênea e, em geral, os valores dos traços de hemácias entre latinos/hispânicos são semelhantes aos de brancos não hispânicos (LIM; MIYAMURA; CHEN, 2015).

No Catálogo GWAS o *NOTCH1* é associado a diversos parâmetros hematológicos, incluindo hemoglobina corpuscular média, contagem de eosinófilos e RDW. Contudo, nenhum dos SNPs para este gene apresentados neste estudo é relatado em Catálogo GWAS, enquanto Pilling *et al.* (2017) apontam o SNP rs3124592 como associado ao RDW.

As diferentes associações em nosso estudo podem ter ocorrido devido à diferença na composição da amostra. Pilling *et al.* (2017) investigou 116666 indivíduos, sendo 4.94% casos, e o nosso estudo inclui 1097 participantes, 12.22% casos. Além disso, a frequência do alelo referência difere nas análises citadas, Pilling *et al.* e o presente estudo, respectivamente: rs3124592, 45.41% e 43.30%; rs9411206, 46.40% e 35.79%; rs2229971, 71.50% e 61.36%; rs9411207, 65.40% e 58.98%; rs11574891, 67.80% e 65.95%. Ainda, os autores afirmam que sua amostra é mais saudável que a população em geral, excluem pacientes anêmicos e possuem uma coorte mais equilibrada com relação ao sexo masculino (47.45%) e feminino (52.55%) se comparado a este estudo (35.92% e 64.08%).

A coorte do presente estudo é miscigenada, apresenta valores elevados de RDW e maior número de comorbidades, além de possuir o dobro de casos, o que pode decorrer da maior idade dos indivíduos. No estudo de Pilling *et al.* (2017), os participantes possuem uma média de 57 anos enquanto a do nosso estudo é de 73 anos. No que se refere aos critérios de seleção, este estudo considerou um $MAF \geq 1\%$ e $HWE > 0.05$, enquanto Pilling *et al.* (2017) consideraram variantes autossômicas com $MAF \geq 0.1\%$, bem como um $HWE > 0.000001$. É possível que as variantes identificadas no nosso estudo e no de Pilling sejam diferentes devido à adoção desses critérios de seleção de SNPs.

De acordo com o projeto ALFA do banco de dados NCBI, a frequência do alelo menor (MAF) para os SNPs rs3124592, rs9411206, rs2229971, rs9411207 e rs11574891 é de cerca de 45.06%, 52.05%, 32.80%, 27.71% e 34.65%, respectivamente (PHAN *et al.*, 2020). Os valores dos rs3124592, rs9411206 e rs9411207 diferiram em nossa população. Analisando projetos com a frequência do alelo de referência, percebe-se

que Pilling *et al.* (2017) possuem frequências similares às demais, se distanciando mais do projeto *1000Genomes* e, principalmente do grupo *Vietnãnese*, que possui as menores frequências. Ainda, no estudo de Pilling *et al.* (2017), o alelo referência do rs2229971 é mais presente que nos demais estudos.

Além da análise laboratorial, a análise *in silico* tem sido uma alternativa que fornece cada vez mais informações acerca do aspecto funcional de SNPs associados a doenças. No *GTEX Portal*, ao analisar os fatores de transcrição relacionados ao rs9411206, identificamos associação com *SDCCAG3*, *DNLZ*, *SEC16A* e *INPP5E*. *SDCCAG3* está associado ao câncer de cólon (HAGEMANN *et al.*, 2012; NEZNANOV *et al.*, 2005); *DNLZ* ao envelhecimento, estabilização e transporte de proteínas para a matriz mitocondrial (NCBI, 2022b); *SEC16A*, um efetor RAB10 necessário para GLUT estimulado por insulina (BRUNO *et al.*, 2016), o que pode ser relacionado à associação de Hb1Ac, assim como *INPP5E*, associado a fenótipos glicometabólicos e presença de eQTLs comuns no tecido adiposo e muscular de afro-americanos (SAJUTHI *et al.*, 2016).

O *INPP5E* atua na mobilização do cálcio intracelular, mediando respostas celulares (NCBI, 2022c). Mutações nesse gene ocasionam a síndrome de Joubert, caracterizada por malformação mesencéfalo-rombencéfalo e ciliopatias associadas (VALENTE; BRANCATI; DALLAPICCOLA, 2008). O rs9411206 (CLINVAR, 2019), localizado em regiões eQTLs e sQTLs, está associado à recorrência pós-operatória de pacientes com carcinoma hepatocelular associado ao vírus da hepatite B e à metástase (BHADORIA; KUMAR; SARIN, 2014).

Em relação aos fatores de transcrição e motivos associados descritos no *Regulome*, em relação ao rs9411206, o gene *RBM14* é fator de risco individual no prognóstico do câncer de fígado (LIU *et al.*, 2021). Enquanto no rs2229971, *GM12878* controla uma via anti-inflamatória (CLINVAR). O rs11574891 interage com *RFX1* e com o motivo *SP3*, com repercussão na tumorigênese (LIU *et al.*, 2018) e na migração, invasão e sinalização de células no câncer de mama (MANSOUR, 2021). O rs9411207 também está relacionado à expressão de *RFX1* e *Zinc Finger Proteins*, sendo *ZIC1* negativamente associado à metástase linfonodal de carcinoma espinocelular cervical (GU *et al.*, 2019), *ZIC2* ao microambiente tumoral, genes relacionados ao tumor e ao

sistema imunológico (LV *et al.*, 2021) e *ZIC3* à regulação do desenvolvimento cardíaco (ZHU *et al.*, 2007).

Quanto aos SNPs marginalmente associados, o rs3124600 interage com 82 fatores de transcrição no sangue como *MEF2D* no músculo esquelético e cardíaco e genes associados a diversos tipos de câncer *HDAC2*, que regula a TP53, *MYC*, *ZNF197*, *RFX1*, *DACH1*, *GATA2*, *PHF20*, *FOXK2*, *KDM5B*, *ETV6*, *KDM4B*, *PHF8*, *CBFA2T3* e *CBFA2T1*. Sendo os dois últimos associados à leucemia (GENECARDS, 2022).

Pilling *et al.* (2017) mostraram enriquecimento para manutenção dos telômeros, homeostase do ferro, RNA ribossômico e apoptose, bem como vias de nucleossomos e histonas. No *Haploreg* todos os SNPs foram relacionados a H3K4me1, uma modificação epigenética de histona que marca regiões de DNA hipometiladas conforme a progressão do envelhecimento em células-tronco e células diferenciadas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014), estando associada a *enhancers* (RADA-IGLESIAS *et al.*, 2010) e ao sangue (FERNÁNDES *et al.*, 2014). Enquanto os *enhancers* atuam como acentuadores da transcrição, a H3K4me1 está relacionada à repressão transcricional, atuando de forma antagônica (ELSNER; SIQUEIRA, 2016).

Além disso, no rVarBase, os SNPs associados interagem com *NOTCH1*, *AGPAT2*, *C9orf163*, *NALT1* e os microRNAs miR4673 e miR4674. Enquanto o rs9411206, interage apenas com *C9orf163*. *AGPAT2* está relacionado à adipogênese (FERNÁNDEZ-GALILEA *et al.*, 2015) e está envolvido com resistência à insulina em camundongos *AGPAT2* (-/-) (CORTÉS *et al.*, 2014); *NALT1* é um indutor de câncer gástrico (PIAO *et al.*, 2019); miR4673 desencadeia a reprogramação e melhora o perfil de aptidão de células neoplásicas por indução de autofagia (DÖKÜMCÜ; SIMONIAN; FARAHANI, 2018); a neutralização do miR-4674 aumenta a angiogênese (ICLI *et al.*, 2020); por fim, *C9orf163* é deletado no câncer de cabeça e pescoço (WANG *et al.*, 2018b) e pode ser regulado negativamente em tumores pancreáticos, sendo positivamente correlacionado à sobrevivência (ZHUANG *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou a associação entre níveis elevados de RDW e variantes no gene *NOTCH1*. A associação entre rs3124592 e RDW não foi validada em nosso estudo, por outro lado, rs9411206, rs2229971, rs9411207 e rs11574891 foram associados a níveis elevados de RDW e podem ser biomarcadores do envelhecimento e doenças crônicas. Entre os haplótipos analisados, o haplótipo 5 incluindo o alelo G do rs9411206 e conferiu um risco duas vezes maior para RDW alto. Assim, estes SNPs podem integrar a arquitetura genética subjacente à variação do tamanho dos eritrócitos, propiciando a anisocitose. Por fim, nossos achados apoiam a hipótese recente de que a associação entre RDW e desfechos negativos pode ser devido a variantes que influenciam o envelhecimento, corroborando evidências recentes em culturas celulares, modelos animais e estudos clínicos.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAN, L. L 4th *et al.* Red Cell Distribution Width and Mortality in Patients With Acute Coronary Syndrome: A Meta-Analysis on Prognosis. **Cardiol Res.** v. 9, p. 144– 152, 2018.
- ALBERTI, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640–1645, 2009.
- ALIS, R *et al.* Influence of age and gender on red blood cell distribution width. **Clin Chem Lab Med.** v. 53, p. e25–e28, 2015.
- 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, 2015.
- ASTLE, W. J. *et al.* The Allelic Landscape of Human Blood Cell Trait Variation and Links to Common Complex Disease. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1415-1429.e19, 2016.
- ATALAY, H. *et al.* Red Cell Distribution Width and Acute Complications of Diabetes. **Acta Endocrinologica (Bucharest)**, v. 14, n. 4, p. 514–519, 2018.
- BHADORIA, A.; KUMAR, N.; SARIN, S. Clinicopathological spectrum of drug induced liver injury: a comparison between anti-tubercular versus other drugs. **Hepatology International.** v. 8, p. S31-32, 2014.
- BAIN, B. J. **Células sanguíneas: um guia prático.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 2004.
- BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.** v. 21, n. 2, p. 263-265, 2005.
- BEARD, J. R *et al.* The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2145–2154, 2016.
- BERNARDINO NETO, M. *et al.* Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables. **Biorheology**, v. 50, n. 5-6, p. 305–320, 2013.
- BEYDOUN, M. A. *et al.* Red Cell Distribution Width Is Directly Associated with Poor Cognitive Performance among Nonanemic, Middle-Aged, Urban Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 1, p. 128–139, 2019.
- BI, P.; KUANG, S. Notch signaling as a novel regulator of metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 248–255, 2015.

- BORNE, Y *et al.* Red cell distribution width in relation to incidence of coronary events and case fatality rates: A population-based cohort study. **Heart**. v. 100, p. 1119–1124, 2014.
- BOYLE, A. P. *et al.* Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 2012.
- BRAY, S. J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2006.
- BRIDE, L *et al.* TCF7L2 rs7903146 polymorphism association with diabetes and obesity in an elderly cohort from Brazil. **PeerJ**. v. 9, 2021.
- BROU, C. *et al.* A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling. **Molecular Cell**, v. 5, n. 2, p. 207–216, 2000.
- BRUNO, J *et al.* SEC16A is a RAB10 effector required for insulin-stimulated GLUT4 trafficking in adipocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 214, n. 1, p. 61–76, 2016.
- BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 1, p. 104-16, 2008.
- CAPORAL, F. A.; COMAR, S. R. Evaluation of RDW-CV, RDW-SD, and MATH-1SD for the detection of erythrocyte anisocytosis observed by optical microscopy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, p. 324-331, 2013.
- CHAMBERS, J. C. *et al.* Genome-wide association study identifies variants in TMPRSS6 associated with hemoglobin levels. **Nature Genetics**, v. 41, n. 11, p. 1170–1172, 2009.
- CHAMI, N. *et al.* Exome Genotyping Identifies Pleiotropic Variants Associated with Red Blood Cell Traits. **The American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 1, p. 8–21, 2016.
- CHAO, C. T *et al.* Hypoglycemic episodes are associated with an increased risk of incident frailty among new onset diabetic patients. **J Diabetes Comp**. v. 34, 2020.
- CHEN, P. C *et al.* Red blood cell distribution width and risk of cardiovascular events and mortality in a community cohort in Taiwan. **Am J Epidemiol**. v. 17, p. 214–220, 2010.
- CHEN, Y. *et al.* Reference values of biochemical and hematological parameters for Guizhou minipigs. **Exp Biol Med**, v. 236, p. 477–82, 2011.
- CHEN, Z. *et al.* Genome-wide association analysis of red blood cell traits in African Americans: the COGENT Network. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 12, p. 2529–2538, 2013.

CHU, Y *et al.* Red blood cell distribution width as a risk factor for in-hospital mortality in obstetric patients admitted to an intensive care unit: a single centre retrospective cohort study. **BMJ Open**, v. 7, n. 6, p. e012849, 2017.

CLINVAR - NCBI. **Nih.gov**. 2019. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/678140/?oq=rs9411206&m=NM_017617.5\(NOTCH1\):c.2587%20103T%3EC](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/678140/?oq=rs9411206&m=NM_017617.5(NOTCH1):c.2587%20103T%3EC)>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

CORTÉS, V. A. *et al.* Leptin ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in Agpat2 lipodystrophic mice independent of hepatocyte leptin receptors. **Journal of Lipid Research**, v. 55, n. 2, p. 276–288, 2014.

DABBAH, S. *et al.* Relation between red cell distribution width and clinical outcomes after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**. v. 105, p. 312–317, 2010.

DING, L. *et al.* Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 305–320.e10, 2018.

DÖKÜMCÜ, K.; SIMONIAN, M.; FARAHANI, R. M. miR4673 improves fitness profile of neoplastic cells by induction of autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 11, 2018.

DU, Y. *et al.* Association of Red Blood Cell Indices with Mild Cognitive Impairment in Chinese Elderly Individuals: A Matched Case-control Study. **Current Alzheimer Research**, v. 17, n. 13, p. 1161–1166, 2021.

ELSNER, V. R.; SIQUEIRA, I. R. **Epigenética aplicada à saúde e a doença: princípios fundamentais baseados em evidências atuais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA, 2016.

EVANS, D. M.; FRAZER, I. H.; MARTIN, N. G. Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. **Twin research: the official journal of the International Society for Twin Studies**, v. 2, n. 4, 2014.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

FAIRFAX, B. P.; KNIGHT, J. C. Genetics of gene expression in immunity to infection. **Curr Opin Immunol**. v. 30, p. 63–71, 2014.

FATUMO, S. *et al.* A roadmap to increase diversity in genomic studies. **Nature Medicine**, v. 28, n. 2, p. 243–250, 2022.

FAVA, C. *et al.* The role of red blood cell distribution width (RDW) in cardiovascular risk assessment: useful or hype? **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 20, p. 581–581, 2019.

FENG, G. *et al.* Red blood cell distribution width and ischaemic stroke. **Stroke and Vascular Neurology**, v. 2, n. 3, p. 172–175, 2017.

FERNÁNDEZ, A. F. *et al.* H3K4me1 marks DNA regions hypomethylated during aging in human stem and differentiated cells. **Genome Research**, v. 25, n. 1, p. 27–40, 2014.

FERNÁNDEZ-GALILEA, M. *et al.* AGPAT2 deficiency impairs adipogenic differentiation in primary cultured preadipocytes in a non-autophagy or apoptosis dependent mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 1, p. 39–45, 2015.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Exp Hematol.** v. 37, p. 1007–1015, 2009.

FUJITA, B *et al.* Altered red blood cell distribution width in overweight adolescents and its association with markers of inflammation. **Pediatr Obes.** v. 8, p. 385–391, 2013.

FYHRQUIST, F. Y.; SAIJONMAA, O. J. Modifiable Factors Influencing Telomere Length and Aging In: BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. **Inflammation, Aging, and Oxidative Stress**. Cham: Springer International Publishing. p. 67-80, 2016.

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

GANESH, S. K. *et al.* Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. **Nature Genetics**, v. 41, n. 11, p. 1191–1198, 2009.

GENECARDS. **Gene NOTCH1 - Receptor Notch 1**. 2022. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NOTCH1&keywords=notch1>>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

GU, X. *et al.* Prognostic and clinicopathological value of ZIC1 in patients with cervical squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, 2019.

DA SILVA GARROTE-FILHO, M.; BERNARDINO-NETO, M.; PENHA-SILVA, N. Influence of Erythrocyte Membrane Stability in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 4, 2017.

GONZALEZ, J. R. *et al.* SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 654–655, 2007.

GROTTO, H. Z. W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Rev. Bras Hematol Hemoter.** v. 32, n. 2, p. 22-8, 2010.

GUO, L. *et al.* rVarBase: an updated database for regulatory features of human variants. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D888–D893, 2015.

HAGEMANN, N *et al.* The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis. **Oncogene**, v. 32, n. 39, p. 4602–4613, 2012.

HAPLOREG V4.1. **Broadinstitute.org**. Disponível em:

<<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

HASTIE, N. D. *et al.* Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. **Nature**, v. 346, n. 6287, p. 866–868, 1990.

HELLE, E. *et al.* Loss of function, missense, and intronic variants in *NOTCH1* confer different risks for left ventricular outflow tract obstructive heart defects in two European cohorts. **Genetic Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 215–226, 2018.

HENNEBERG, R *et al.* Ferrocínica e índices hematológicos no diagnóstico laboratorial da anemia ferropriva – revisão bibliográfica. **NewsLab**, v. 107, p. 134-144, 2011.

HINCKLEY, J. D. *et al.* Quantitative trait locus linkage analysis in a large Amish pedigree identifies novel candidate loci for erythrocyte traits. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 1, n. 3, p. 131–141, 2013.

HODONSKY, C. J. *et al.* Genome-wide association study of red blood cell traits in Hispanics/Latinos: The Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 4, p. e1006760, 2017.

HOFFMANN, J. J.; NABBE, K. C.; VAN DEN BROEK, N. M. Effect of age and gender on reference intervals of red blood cell distribution width (RDW) and mean red cell volume (MCV). **Clin Chem Lab Med**. v. 53, p. 2015–2019, 2015.

HOFFMANN, J. J. M. L.; URRECHAGA, E. Role of RDW in mathematical formulas aiding the differential diagnosis of microcytic anemia. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 80, n. 6, p. 464–469, 2020.

HOFFMANN, J. J.; VAN DEN BROEK, N. M.; CURVERS, J. Reference intervals of extended erythrocyte and reticulocyte parameters. **Clin Chem Lab Med**. v. 50, p. 941–948, 2012.

HORNE, B. D. *et al.* The Intermountain Risk Score (including the red cell distribution width) predicts heart failure and other morbidity endpoints. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 11, p. 1203–1213, 2010.

ICLI, B. *et al.* MiR-4674 regulates angiogenesis in tissue injury by targeting p38K signaling in endothelial cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 318, n. 3, p. C524–C535, 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE - AGÊNCIA DE NOTÍCIAS. **Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017**. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>>.

INUZUKA, R.; ABE, J. Red Blood Cell Distribution Width as a Link Between Ineffective Erythropoiesis and Chronic Inflammation in Heart Failure. **Circ J.** v. 79, p. 3–4, 2015.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 11^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KAMATANI, Y. *et al.* Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. **Nature Genetics**, v. 42, n. 3, p. 210–215, 2010.

KATYAL, R.; JANMEJA, A.; KU, V. Red cell distribution width (RDW) as a biomarker of disease severity in ILD patients. **European Respiratory Journal**, v. 46, 2015.

KNYCHALA, M. A. *et al.* Red cell distribution width and erythrocyte osmotic stability in type 2 diabetes mellitus. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 5, p. 2505–2516, 2021.

KOZLITINA, J.; GARCIA, C. K. Red Blood Cell Size Is Inversely Associated with Leukocyte Telomere Length in a Large Multi-Ethnic Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51046, 2012.

KULLO, I. J. *et al.* A Genome-Wide Association Study of Red Blood Cell Traits Using the Electronic Medical Record. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e13011, 2010.

KUSHNER, I. The Phenomenon Of The Acute Phase Response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 389, n. 1 C-Reactive Pr, p. 39–48, 1982.

LECOURTOIS, M.; SCHWEISGUTH, F. Indirect evidence for Delta-dependent intracellular processing of Notch in *Drosophila* embryos. **Current Biology**, v. 8, n. 13, p. 771–775, 1998.

LI, J. *et al.* GWAS of blood cell traits identifies novel associated loci and epistatic interactions in Caucasian and African-American children. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 7, p. 1457–1464, 2012.

LI, N. *et al.* Prognostic Role of the Pretreatment C-Reactive Protein/Albumin Ratio in Solid Cancers: A Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

LIM, E.; MIYAMURA, J.; CHEN, J. J. Racial/Ethnic-Specific Reference Intervals for Common Laboratory Tests: A Comparison among Asians, Blacks, Hispanics, and White. **Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health**, v. 74, n. 9, 2015.

LIPPI, G *et al.* Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients. **Kardiol Pol.** v. 71, p. 931–6, 2013.

LIPPI, G *et al.* Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: Facts and speculation. **Critic Rev Clin Lab Sci.** v. 43, p. 349–391, 2006.

LIPPI, G.; MATTIUZZI, C. The biomarker paradigm: between diagnostic efficiency and clinical efficacy. **Pol Arch Med Wewn**, v. 125, n. 4, p. 282-8, 2015.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. Red blood cell distribution width (RDW) and human pathology. One size fits all. **Clin Chem Lab Med**, v. 52, n. 9, p. 1247-9, 2014.

LIPPI, G.; SALVAGNO, G. L.; GUIDI, G. C. Red blood cell distribution width is significantly associated with aging and gender. **Clin Chem Lab Med**. v. 52, p. e197–199, 2014.

LIU, G. *et al.* Prognostic gene biomarker identification in liver cancer by data mining. **American journal of translational research**, v. 13, n. 5, p. 4603–4613, 2021.

LIU, Y. *et al.* Association analysis of polymorphisms of porcine LMP2 and LMP7 genes with haematological traits. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4455–4460, 2011.

LIU, Y. *et al.* Downregulation of RFX1 predicts poor prognosis of patients with small hepatocellular carcinoma. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 44, n. 7, p. 1087–1093, 2018.

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

LÓPEZ-OTÍN C. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**. v. 153, p. 1194–217, 2013.

LORENTE, L. *et al.* Association between red blood cell distribution width and mortality of COVID-19 patients. **Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine**, v. 40, n. 1, p. 100777, 2021.

LUO, W. *et al.* Genome-wide Association Study of Porcine Hematological Parameters in a Large White x Minzhu F2 Resource Population. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 6, p. 870–881, 2012.

LV, Z. *et al.* Zic Family Member 2 (ZIC2): a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Pan-Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 2021.

MALACARDS. **MalaCards - Human Disease Database**. Disponível em: <<https://www.malacards.org/>>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

MALACHIAS, M. V. B. *et al.* 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, Supl. 3, 2016.

MANSOUR, M. A. SP3 is associated with migration, invasion, and Akt/PKB signalling in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 3, 2020.

MATSUNO, K. Notch signaling. **Development, Growth & Differentiation**, v. 62, n. 1, p. 3–3, 2020.

MUMM, J. S. *et al.* A Ligand-Induced Extracellular Cleavage Regulates γ -Secretase-like Proteolytic Activation of Notch1. **Molecular Cell**, v. 5, n. 2, p. 197–206, 2000.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Lifestyle effects on hematopoiesis and atherosclerosis. **Circ Res**. v. 116, n. 884, 2015.

NASCIMENTO, M. L. Por que na relação entre a concentração de hemoglobina globular média e a contagem de hemácias a avaliação do RDW-SD é importante? **NewsLab**. v. 61, p. 94-104, 2003.

NASLAVSKY, M.S *et al.* Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat**. v. 38, n. 7, p. 751-763, 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**. v. 10, n. 24 2020.

NCBI. **NOTCH1 notch receptor 1 [Homo sapiens (human)]**. 2022a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4851>>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

NCBI. **DNLZ DNL-type zinc finger [Homo sapiens (human)]**. 2022b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/728489>>. Acesso em: 30 de maio de 2022.

NCBI. **INPP5E inositol polyphosphate-5-phosphatase E [Homo sapiens (human)]**. 2022c. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56623#gene-expression>>. Acesso em: 30 de maio de 2022.

NEHRING, S. M.; GOYAL, A.; PATEL, B. C. **C Reactive Protein**. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441843/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2022.

NEZNANOV, N. *et al.* Serologically Defined Colon Cancer Antigen 3 Is Necessary for the Presentation of TNF Receptor 1 on Cell Surface. **DNA and Cell Biology**, v. 24, n. 12, p. 777–785, 2005.

OMIM. **OMIM: An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders**. 2022. Disponível em: <<https://omim.org/>>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

PATEL, K. V *et al.* Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. **Arch Intern Med**. v. 169, p. 515–23, 2009.

PATEL, K. V *et al.* Red cell distribution width and mortality in older adults: a meta-analysis. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 65, p. 258–65, 2010.

PELOSO, G. M. *et al.* Association of Exome Sequences With Cardiovascular Traits Among Blacks in the Jackson Heart Study. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 9, n. 4, p. 368–374, 2016.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, Supl. 1, 2017.

PERLSTEIN, T. S. *et al.* Red Blood Cell Distribution Width and Mortality Risk in a Community-Based Prospective Cohort. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 6, p. 588, 2009.

PAN, J.; BORNÉ, Y.; ENGSTRÖM, G. The relationship between red cell distribution width and all-cause and cause-specific mortality in a general population. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

PHAN, L. *et al.* **ALFA: Allele Frequency Aggregator**. Bethesda: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa. Published 2020.

PIAO, H. *et al.* Long noncoding RNA NALT1-induced gastric cancer invasion and metastasis *via* NOTCH signaling pathway. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 44, p. 6508–6526, 2019.

PIERRE, R. V. Red cell morphology and the peripheral blood film. **Clin Lab Med**, v. 22, n. 1, p. 25-61, 2002.

PILEGGI, S. *et al.* Sequencing of *NOTCH1* gene in an Italian population with bicuspid aortic valve: Preliminary results from the GISSI OUTLIERS VAR study. **Gene**, v. 715, p. 143970, 2019.

PILLING, L. C. *et al.* Red blood cell distribution width: Genetic evidence for aging pathways in 116,666 volunteers. **PLoS One**. v. 12, 2017.

PILLING, L. C. *et al.* Red cell distribution width and common disease onsets in 240,477 healthy volunteers followed for up to 9 years. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0203504, 2018.

QIU, J. H. Detection of haemal physiological and biochemical parameters in Putian black pigs. **J Mountain Agric Biol**. v. 28, p. 317–23, 2009.

QIAO, R. *et al.* Complete blood count reference intervals and age- and sex-related trends of North China Han population. **Clin Chem Lab Med**. v. 52, p. 1025–1032, 2014.

RADA-IGLESIAS, A. *et al.* A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. **Nature**, v. 470, p. 279-283, 2010.

RANZANI, O. T. *et al.* C-Reactive Protein/Albumin Ratio Predicts 90-Day Mortality of Septic Patients. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59321, 2013.

- RODRIGUES, R. *et al.* Correlations of the glycemic variability with oxidative stress and erythrocytes membrane stability in patients with type 1 diabetes under intensive treatment. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 144, p. 153–160, 2018.
- ROSA-GARRIDO, M.; CHAPSKI, D. J.; VONDRISKA, T. M. Epigenomes in cardiovascular disease. **Circ Res**. v. 122, p. 1586–1607, 2018.
- ROSATI, E. *et al.* NOTCH1 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.
- ROWAN, R. M. *et al.* The Coulter Counter Model S Plus-- the shape of things to come. **Clin Lab Haematol**, v. 1, n. 1, p. 29-40, 1979.
- RVARBASE. **Psych.ac.cn**. Disponível em: <<http://rv.psych.ac.cn/>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.
- SAJUTHI, S. P. *et al.* Mapping adipose and muscle tissue expression quantitative trait loci in African Americans to identify genes for type 2 diabetes and obesity. **Human Genetics**, v. 135, n. 8, p. 869–880, 2016.
- SALVAGNO, G. L. *et al.* Red blood cell distribution width: A simple parameter with multiple clinical applications. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v. 52, p. 86–105, 2015.
- SCHAID, D. J. *et al.* Score Tests for Association between Traits and Haplotypes when Linkage Phase Is Ambiguous. **The American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 2, p. 425–434, 2002.
- SCHROETER, E; KISSLINGER, J. A.; KOPAN, R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 382–386, 1998.
- SENTHONG, V. *et al.* Relation of Red Cell Distribution Width to Left Ventricular End-Diastolic Pressure and Mortality in Patients With and Without Heart Failure. **The American Journal of Cardiology**, v. 119, n. 9, p. 1421–1427, 2017.
- SGNAOLIN, V. *et al.* Hematological parameters and prevalence of anemia among free-living elderly in south Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 2, 2013.
- SHAH, P. A. *et al.* NOTCH1 Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2677, 2020.
- SHARMA, R.; AGRAWAL, V. V. The Relationship Between Red Blood Cell Distribution Width (RDW CV) And C Reactive Protein (CRP) With The Clinical Outcomes In Non-ST Elevation Myocardial Infarction And Unstable Angina Pectoris: A 6 Months Follow Up Study. **Int Cardiovasc Forum J**. v. 2, p. 27–31, 2015.
- SORANZO, N. *et al.* A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. **Nature Genetics**, v. 41, n. 11, p. 1182–1190, 2009.

STEINE, I. M. *et al.* Implication of *NOTCH1* gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. e977–e977, 2016.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Clannad Editora Científica, 2019.

SU, C. *et al.* The role of red blood cell distribution width in mortality and cardiovascular risk among patients with coronary artery diseases: a systematic review and meta-analysis. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 10, p. 1429–40, 2014.

TAJUDDIN, S. M. *et al.* Association of red cell distribution width with all-cause and cardiovascular-specific mortality in African American and white adults: a prospective cohort study. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, 2017.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S. W. Epigenetics: The link between nature and nurture. **Mol Aspects Med**. v. 34, p. 753–764, 2013.

TONELLI, M. *et al.* Relation between red blood cell distribution width and cardiovascular event rate in people with coronary disease. **Circulation**. v. 117, p. 163-168, 2008.

TURCATO, G *et al.* Red blood cell distribution width independently predicts medium-term mortality and major adverse cardiac events after an acute coronary syndrome. **Ann Transl Med**. v. 4, p. 254–254, 2016.

UNITED NATIONS (ST/ESA/SER.A/390). **World Population Ageing**, New York, 2019. Disponível em: <[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\)Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019)Highlights.pdf)>.

VALENTE, E. M.; BRANCATI, F.; DALLAPICCOLA, B. Genotypes and phenotypes of Joubert syndrome and related disorders. **European Journal of Medical Genetics**, v. 51, n. 1, p. 1–23, 2008.

VAN DER HARST, P. *et al.* Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 369–375, 2012.

VAYÁ, A. *et al.* Red Blood Cell Distribution Width in Patients With Cryptogenic Stroke. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 21, n. 3, p. 241–245, 2014.

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. 31180–31186, 2017.

WANG, B *et al.* The Association between Red Blood Cell Distribution Width and Mortality in Critically Ill Patients with Acute Kidney Injury. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–7, 2018a.

WANG, G. *et al.* Deletion of C9orf53 promotes the growth of head and neck squamous cell carcinoma and is associated with poor prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, 2018b.

WANG, J. Y. *et al.* Genome-wide association studies for hematological traits in swine. **Animal Genetics**, v. 44, n. 1, p. 34–43, 2013.

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, 2015.

WONG, K. C. *et al.* Uncovering Clinical Risk Factors and Predicting Severe COVID-19 Cases Using UK Biobank Data: Machine Learning Approach. **JMIR Public Health and Surveillance**, v. 7, n. 9, p. e29544, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**. Brasília, 2005. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/envelhecimento_ativo.pdf>. Acesso em 12 de julho de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Ageing and health**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

XU, W. *et al.* Red Blood Cell Distribution Width Levels Correlate With Liver Fibrosis and Inflammation. **Medicine**, v. 94, n. 10, p. e612, 2015.

YAZICI, P. *et al.* What is the effect of treatment modality on red blood cell distribution width in patients with acute cholecystitis? **Turkish Journal of Surgery**, v. 31, n. 1, p. 1–4, 2015.

ZHANG, M. *et al.* Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas? **Cancer Medicine**, v. 5, n. 8, p. 2048–2060, 2016.

ZHU, L. *et al.* Identification of a novel role of ZIC3 in regulating cardiac development. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 14, p. 1649–1660, 2007.

ZHUANG, H. *et al.* A four prognosis-associated lncRNAs (PALnc) based risk score system reflects immune cell infiltration and predicts patient survival in pancreatic cancer. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, 2020.

APÊNDICE

APÊNDICE I

Tabela Suplementar 1 - Frequências dos SNPs em diferentes populações mundiais de acordo com diversos projetos de genômica

SNP	Alelo	Fernandes <i>et al.</i>	Pilling <i>et al.</i>	Alfa	1000Genomes	TOPMED	GnomAD	NorthernSweden	ALSPAC	TWINSUK	Vietnamese	Estonian
rs3124592	G	43.30%	45.41%	45.06%	35.22%	43.27%	44.51%	47.33%	43.85%	46.39%	2.89%	43.08%
rs9411206	A	35.79%	46.40%	47.95%	24.96%	31.05%	31.01%	42.17%	45.38%	46.52%	4.29%	36.76%
rs2229971	A	61.36%	71.50%	67.20%	47.22%	55.51%	56.00%	65.33%	70.89%	71.95%	20.75%	65.07%
rs9411207	C	58.98%	65.40%	72.29%	43.67%	52.33%	52.55%	58.50%	65.52%	65.83%	18.22%	58.88%
rs11574891	G	65.95%	67.80%	65.35%	61.08%	62.73%	62.31%	63.83%	67.90%	68.02%	69.81%	64.49%

Abreviaturas: SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*.

ANEXOS



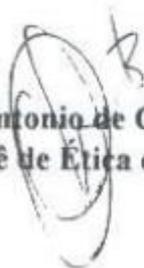
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FSP/USP - COEP
Av. Dr. Arnaldo, 715 - CEP 01246-904 - São Paulo - Brasil
Telefones: (55-11) 3066 7742 - fax (55-11) 3064 7314

Of.COEP/67/99

24 de maio de 1999

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa, **aprovou**, em sua 3.ª/99, Sessão Ordinária, de 19.05.99, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o Projeto de Pesquisa “AS CONDIÇÕES DE SAÚDE DOS IDOSOS NA AMÉRICA DO SUL E CARIBE”, apresentado pelo pesquisador Ruy Laurenti, devendo ser remetido à CONEP conforme as normas da Resolução 196/96.

Atenciosamente,


Prof.Dr. Paulo Antonio de Carvalho Fortes
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP



Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

COMITÊ DE ÉTICA - COEP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Assessoria Acadêmica - CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil
Telefones: (55-11) 3066-7779 – e-mail: coep@fsp.usp.br

Of.COEP/83/06

14 de março de 2006

Pelo presente, informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, **aprovou** o Protocolo de Pesquisa n.º 1345, intitulado: “PROJETO SABE-2005 – SAÚDE, BEM-ESTAR E ENVELHECIMENTO. AS CONDIÇÕES DE SAÚDE E DE VIDA DOS IDOSOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO”, apresentado pela pesquisadora Maria Lúcia Lebrão.

Atenciosamente,

Helena Akemi Wada Watanabe
Professora Doutora

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP-COEP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/23/10

5 de março de 2010.

Prezado(a) Pesquisador(a) e Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP/FSP, **analisou**, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º **2044**, intitulado **"ESTUDO SABE 2010: SAÚDE, BEM-ESTAR E ENVELHECIMENTO - ESTUDO LONGITUDINAL SOBRE AS CONDIÇÕES DE VIDA E SAÚDE DOS IDOSOS NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO"**, área temática **GRUPO III**, sob responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Maria Lucia Lebrão**, e considerou que a pendência anteriormente apresentada por este COEP foi atendida. Protocolo de pesquisa **APROVADO "AD-REFERENDUM"**.

Cabe lembrar que conforme Resolução CN /196/96, são deveres do (a) pesquisador (a): **1. Comunicar**, de imediato, qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste CEP (Comitê de Ética em Pesquisa), para dar continuidade à pesquisa; **2. Manter sob sua guarda e em local seguro**, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP, no caso eventual auditoria; **3. Comunicar**, formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; **4. Elaborar e apresentar relatórios parciais e final**; **5. Justificar**, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Cláudio Leone
Professor Titular

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - COEP

Ilm.º Sr.º
Prof.º Tit. Maria Lucia Lebrão
Departamento de Epidemiologia da FSP/USP

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: SÃO PAULO

Telefone: (11)3061-7779

Fax: (11)3061-7779

E-mail: coep@fsp.usp.br

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 3.600.782

estudo de que sua amostra de sangue poderá ser levada ao exterior para a realização de exames genéticos de interesse para o estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero que os esclarecimentos adicionais prestados pela proponente são suficientes e recomendo aprovação do presente projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_518377.pdf	24/07/2019 16:52:18		Aceito
Outros	Resposta_pendencia_Yeda.docx	24/07/2019 16:51:38	YEDA APARECIDA DE OLIVEIRA DUARTE	Aceito
Declaração de concordância	Justificativasabe.pdf	14/02/2017 17:23:46	Márcia Ferreira dos Santos	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Deacordosabe.pdf	14/02/2017 17:23:46	Márcia Ferreira dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE03092015.pdf	03/09/2015 12:27:45	MARIA LUCIA LEBRÃO	Aceito
Folha de Rosto	pagina rosto Coep SABE 15.pdf	15/06/2015 13:09:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto SABE 2015.pdf	08/06/2015 21:09:45		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

USP - FACULDADE DE SAÚDE
PÚBLICA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FSP/USP



Continuação do Parecer: 3.600.782

SAO PAULO, 26 de Setembro de 2019

Assinado por:
José Leopoldo Ferreira Antunes
(Coordenador(a))

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



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

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

**POLIMORFISMOS E HAPLÓTIPOS EM *NOTCH1*
ESTÃO ASSOCIADOS AO RDW**

VITÓRIA

2022

PPGBiotec

IZADORA SILVEIRA FERNANDES

2022