



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Daniela Filadelfo Sanches

**Polimorfismo do gene *Ace 2* em pacientes com
doença de Chagas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Cilmary Suemi Kurokawa
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Rodrigo Mattos dos Santos

Botucatu

2023

Daniela Filadelfo Sanches

Polimorfismo do gene *Ace2* em pacientes com doença
de Chagas

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Doenças Tropicais.

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Cilmary Suemi Kurokawa

Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Rodrigo Mattos dos Santos

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Sanches, Daniela Filadelfo.

Polimorfismo do gene Ace2 em pacientes com doença de Chagas
/ Daniela Filadelfo Sanches. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Cilmerly Suemi Kurokawa

Coorientador: Rodrigo Mattos dos Santos

Capes: 20205007

1. Chagas, Doença de. 2. Peptidil Dipeptidase A.
3. Polimorfismo (Genética).

Palavras-chave: Doença de Chagas; Enzima conversora de
angiotensina ; Polimorfismo.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DANIELA FILADELFO SANCHES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 28 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de DANIELA FILADELFO SANCHES, intitulada **Polimorfismo do gene Ace 2 em pacientes com doença de Chagas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO (Participação Virtual) do(a) Universidade do Oeste Paulista / Presidente/SP, Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS (Participação Virtual) do(a) Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu - Unesp. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DANIELA FILADELFO SANCHES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 28 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de DANIELA FILADELFO SANCHES, intitulada **Polimorfismo do gene Ace 2 em pacientes com doença de Chagas**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto. de Pediatria / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ELIANA PERESI LORDELO (Participação Virtual) do(a) Universidade do Oeste Paulista / Presidente/SP, Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS (Participação Virtual) do(a) Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu - Unesp. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Dra. CILMERY SUEMI KUOKAWA

Este trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) e Ambulatório de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP)

DEDICATÓRIA

À minha amada família, que são tudo na minha vida;

A todos meus amados amigos;

À minha querida e admirável orientadora Profª Draª Cilmery;

Ao meu querido e admirável coorientador Profº Drº Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me capacitar e fortalecer a cada dia e nos momentos em que eu imaginei que não conseguiria.

A Nossa Senhora Aparecida, por sempre me envolver sob a proteção de seu manto sagrado, nos momentos em que senti medo e vontade de desistir.

A minha amada mãe Cidinha, que nunca nos deixou faltar nada, fez o impossível para nos ver feliz e tirou de si para nos oferecer o melhor. Meu maior exemplo de inspiração, força, amor, apoio para escolhas difíceis, apoio para realização dos meus sonhos e resiliência.

Aos meu amado pai Luiz, pelo amor incondicional, por sempre me apoiar em minhas escolhas.

Ao meu amado esposo Fabiano, pelo seu amor eu tudo que faz por mim, por ser meu maior incentivador para que eu iniciasse essa jornada, por sempre me mostrar que sou capaz e pelas inúmeras vezes que me acalmou com suas palavras e demonstrações de afeto.

Ao meu amado enteado e filho do coração Davi, que me apresentou o amor de "madrasta" e mesmo sendo tão pequeno, entendeu os momentos em que estive ausente, para que esse sonho se tornasse realidade.

Ao meu amado irmão, por todo cuidado, amor e apoio em várias etapas da minha formação.

Aos meus amados sogros, por todo amor com que sempre me apoiam e por não medirem esforços para me ajudarem durante todo esse processo.

A toda minha família, que são tudo na minha vida: Avós, cunhada, sobrinho, tios, primos. Cada um de alguma forma contribuiu para que esse sonho fosse possível.

Aos meus amigos de longa data, por sempre compreenderem os momentos em que estive ausente, por sempre me apoiarem e por todo amor.

Aos queridos colegas e amigos, que me presentearam com sua amizade e ajuda, desde o momento em que cheguei a UNESP, os levarei para sempre comigo.

Ao laboratório Santa Mônica de Piraju, ao meu patrão Gustavo e a todos os funcionários que se tornaram amigos tão especiais na minha vida, por me apoiarem e me ajudarem desde o momento em que fui contratada.

Em especial a minha querida orientadora Dra. Cilmary, que se tornou uma grande amiga, por ter me acolhido, por não ter permitido que eu desistisse, por todo auxílio durante a execução deste trabalho; pela paciência, pelos “puxões” de orelha, por ter acreditado mais em mim do que eu mesma e por todo ensinamento que com certeza levarei por toda minha vida.

Em especial ao meu coorientador Dr. Rodrigo, que também se tornou um grande amigo e que desde a graduação sempre me acolheu, me incentivou e por toda paciência durante todo esse percurso.

Ao Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, agradeço a oportunidade que me foi oferecida para o desenvolvimento deste trabalho e pela contribuição à minha formação.

Ao Coordenador Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza e demais membros do conselho de Pós-graduação.

Aos professores, cada um que de alguma forma contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal, compartilhando seus conhecimentos através das aulas ministradas durante esses anos.

Ao Dr. Paulo Câmara Marques e Dra. Erika Pellison do Departamento de Doenças Tropicais, Diagnóstico por Imagem e Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP, pelo atendimento dos pacientes e contribuição clínica fornecida ao nosso estudo.

Aos funcionários do Departamento de Doenças Tropicais, Diagnóstico por Imagem e Dermatologia, UNIPEX, da Faculdade de Medicina de Botucatu, bibliotecárias, seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina, pela prontidão em servir e auxiliar na parte técnica e burocrática deste trabalho.

Aos residentes, enfermeiros e atendentes do ambulatório de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e Dermatologia, pelo atendimento aos pacientes deste estudo.

A Flávia Hebeler Barbosa Pavão, pela disponibilidade e pelo auxílio na excelente execução dos resultados deste trabalho.

Ao estatístico pela disponibilidade e contribuição.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição para nosso trabalho.

EPÍGRAFE

*“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”*
(São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. DOENÇA DE CHAGAS E HIPERTENSÃO	14
1.2. POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO SIMPLES	18
1.3 GENE <i>ACE2</i> (ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA)	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	26
5.1. PACIENTES E GRUPOS	26
5.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	26
5.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	29
5.4 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	29
5.5. MÉTODOS	29
5.5.1 Coleta de sangue periférico	29
5.5.2 Extração de DNA genômico	29
5.5.3 Reação em cadeia da polimerase para os SNPS	30
5.5.4 Genotipagem do SNP rs 2074192	30
5.5.5 Comparação do <i>amplicon</i> com o gene <i>ACE 2</i>	31
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6. RESULTADOS	32
6.1. DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	32
6.2. SEQUENCIAMENTO	36
6.2.1 Extração de DNA	36
6.2.2 Produtos da PCR obtidos com o primer para o rs 2074192 e purificação	36
6.2.3 Sequenciamento e análise no BLASTn	39
7. DISCUSSÃO	46
8. CONCLUSÃO	52
9. REFERÊNCIAS	53
10. ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição, prevalência e incidência da doença de Chagas	14
Figura 2- Localização e características do gene ACE 2	20
Figura 3- Atuação da ACE 2 no controle dos níveis pressóricos	22
Figura 4- Mapa da procedência dos pacientes com doença de Chagas no Estado de São Paulo	32
Figura 5- Fluxograma da procedência dos pacientes com doença de Chagas no Estado de São Paulo	33
Figura 6- Produtos de PCR obtidos de amostras de DNA extraído de pacientes	37
Figura 7- Produtos de PCR obtidos de amostras de DNA extraído de pacientes	38
Figura 8- Análise do início do <i>amplicon</i> obtido para o gene <i>ACE2</i>	39
Figura 9- Análise do meio do <i>amplicon</i> obtido para o gene <i>ACE2</i>	39
Figura 10- Análise do fim do <i>amplicon</i> obtido para o gene <i>ACE2</i>	40
Figura 11- Análise do sequenciamento do fragmento de 500 bp	40
Figura 12- Descrição do alinhamento no Blastn	41
Figura 13- Resumo gráfico do alinhamento no Blastn	41
Figura 14- Alinhamento base a base e pontos de não alinhamento no Blastn	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Vias de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> comprovadas	15
Tabela 2- Classificação dos valores dos exames bioquímicos em sangue	27
Tabela 3- Média e desvio das características clínicas e laboratoriais dos pacientes com doença de Chagas	34
Tabela 4- Comorbidades e etnia em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas	35
Tabela 5- Classe dos medicamentos utilizados para o tratamento de hipertensão, hipercolesterolemia e hiperglicemia nos pacientes com doença de Chagas em sua forma crônica indeterminada e cardíaca.	36
Tabela 6- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) para o gene ACE2 (rs2074192) de pacientes com doença de Chagas	43
Tabela 7- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) para o gene ACE2 (rs2074192) de pacientes com doença de Chagas	43
Tabela 8- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca, considerando presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), SNP para o gene ACE2 (G), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).	44
Tabela 9- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca considerando a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).	44
Tabela 10- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca considerando a presença de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) para o gene ACE2(G), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACEH	Angiotensin converting enzyme homolog
DAC	Doença arterial coronariana
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DM	Diabetes Mellitus
ECG	Eletrocardiograma
HAI	Hemaglutinação Indireta
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IFI	Imunofluorescência indireta
IMC	Índice de massa corpórea
KB	Kilobase
KG	Quilograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RS	Reference sequence
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo simples
SRA	Sistema renina angiotensina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGL	Triglicerídeos

RESUMO

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (DC) é uma doença zoonótica caracterizada por progressão crônica, endêmica em 21 países da América Latina, afetando aproximadamente 6 milhões de indivíduos, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*. A DC apresenta duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda ocorre após o contágio e a crônica após um período de dois meses do primeiro contato; a cronificação assintomática da doença, é definida como forma indeterminada. Nesse período, o paciente não apresenta sintomas, mas ao evoluir para a fase crônica sintomática os indivíduos podem apresentar sintomas cardíacos e digestivos, sendo classificados com a forma clínica crônica, conforme o órgão infectado. Características das cepas do agente infectante, resposta imunológica contra o parasita, a carga genética do paciente e do parasita, além de comorbidades preexistentes, são relacionadas à evolução dos sintomas clínicos ou na ausência deles. Neste sentido estudos sobre *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) associados a estas comorbidades, podem auxiliar na compreensão da fisiopatologia da DC. Polimorfismos em genes como *ACE2*, que está associado a hipertensão, podem esclarecer alguns aspectos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o polimorfismo do gene *ACE 2-rs 2074192* por meio da técnica de sequenciamento de Sanger e relacioná-lo com as comorbidades dos pacientes nas duas formas clínicas crônicas da doença de Chagas, indeterminada e cardíaca. Foram incluídos pacientes do sexo masculino, com a forma clínica crônica indeterminada (n=46) e cardíaca (n=18) da DC, atendidos no ambulatório do HC-FMB/ UNESP. Os dados clínicos foram retirados do prontuário eletrônico e a avaliação do SNP foi realizada em células nucleadas do sangue periférico pelo método de Sanger. Os resultados obtidos demonstraram que as características clínicas (idade, índice de massa corpórea ou IMC, etnia) não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Os pacientes com DC apresentaram idade média de 64 anos para a forma indeterminada e 66 anos para a forma cardíaca, ambos classificados como idosos. O IMC foi de 26 kg/ m² para os dois grupos. Os valores de triglicerídeos, HDL e glicose apresentaram valores semelhantes aos níveis de normalidade. A avaliação do SNP para o gene *ACE 2-rs 2074192* não mostrou diferenças nas frequências de guanina (G) e adenina (A). As avaliações para presença de hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes também não demonstraram diferenças nas frequências de alelos G e A. Por fim, nosso estudo não apresentou relação entre a presença do polimorfismo e a forma clínica da DC.

Palavras chave: Doença de Chagas; Enzima conversora de angiotensina; polimorfismo.

ABSTRACT

American Trypanosomiasis is a zoonotic disease characterized by chronic progression, endemic in 21 Latin American countries, affecting approximately 6 million individuals. Chagas disease (CD) has *Trypanosoma cruzi* as the responsible agent. CD has two distinct phases: acute and chronic. The acute phase occurs after contagion and the chronic phase after a period of two months from the first contact; the asymptomatic chronification of the disease is defined as an indeterminate form. During this period, the patient does not have symptoms, but when progressing to the symptomatic chronic phase, individuals may have cardiac and digestive symptoms, being classified with the chronic clinical form, according to the infected organ. Characteristics of the infecting agent strains, immune response against the parasite, the genetic load of the patient and the parasite, in addition to preexisting comorbidities, are related to the evolution of clinical symptoms or their absence. In this sense, studies on Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) associated with these comorbidities may help in understanding the pathophysiology of CD. Polymorphisms in genes such as ACE2, which is associated with hypertension, may clarify some aspects. This study aimed to evaluate the polymorphism of the ACE 2-rs 2074192 gene using the Sanger sequencing technique and relate it to the comorbidities of patients in the two chronic clinical forms of Chagas disease, indeterminate and cardiac. Male patients with the undetermined chronic (n=46) and cardiac (n=18) clinical form of CD, seen at the HC-FMB/UNESP outpatient clinic, were included. Clinical data were taken from the electronic medical record and the SNP evaluation was performed in peripheral blood nucleated cells using the Sanger method. The results obtained showed that the clinical characteristics (age, BMI, ethnicity) did not present statistically significant differences. CD patients had a mean age of 64 years for the indeterminate form and 66 years for the cardiac form, both classified as elderly. BMI was 26 kg/m² for both groups. The values of triglycerides, HDL and glucose showed values similar to normality levels. SNP evaluation for the ACE 2-rs 2074192 gene did not show differences in guanine (G) and adenine (A) frequencies. Assessments for the presence of hypertension, obesity, dyslipidemia and diabetes also did not show differences in the frequencies of SNP G and A.

Keywords: Chagas disease; Angiotensin converting enzyme; polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS E HIPERTENSÃO

A Tripanossomíase Americana é uma zoonose caracterizada por desencadear infecção generalizada, com possível evolução crônica, de caráter endêmico, sendo frequentemente descrita como doença de Chagas (DC). O agente causador da DC é o protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) hemoflagelado intracelular, pertencente a subfamília *Triatominae*, compondo uma variedade de 142 espécies. O triatomíneo transmissor, vetor da DC, é um inseto hematófago de hábitos noturnos, sendo conhecido popularmente como barbeiro (1-4).

A DC é endêmica em 21 países latino-americanos, afetando aproximadamente seis milhões de indivíduos. Possui incidência nessa região continental de 30 mil novos casos a cada ano, com uma estimativa de 14 mil mortes anuais. Estimativas apontam que há 70 milhões de indivíduos vivendo em áreas favoráveis à exposição, aumentando assim a probabilidade de contrair a doença (5) (Figura 1). No Brasil, a DC tanto na fase aguda quanto na crônica, tornou-se um agravo de notificação compulsória desde maio de 2020 (5-7).



FIGURA 1- Distribuição, prevalência e incidência da Doença de Chagas.
Fonte: DNDi América Latina, 2019.

A transmissão é classicamente vetorial através do contato com as fezes e/ou urina contaminadas destes triatomíneos. *T. cruzi* não é transmitido somente por vetores ou o que se denomina de via vetorial, podendo ainda ser transmitido ao ser humano por diferentes vias, das quais são classificadas conforme a tabela 1.

TABELA 1- Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi* comprovadas.

VIA DE TRANSMISSÃO	DEFINIÇÃO
Vetorial	Transmitida pelas fezes e/ou urina de triatomíneo no momento do repasto sanguíneo no hospedeiro.
Transfusional	Transmissão ocorre por transfusão sanguínea de doadores que não realizaram a triagem. Ocorrência em locais sem banco de sangue.
Transplante de órgãos sólidos	Transmissão ocorre por transplante de órgãos de doadores não identificados, sem normatização.
Vertical	Transmissão entre mãe infectada e feto saudável durante a gestação. Acomete em média, oito mil recém-nascidos
Leite materno	Transmissão ocorre entre mãe infectada e seu recém-nascido saudável, sendo mais frequente na fase aguda da DC.
Oral	Transmissão por meio de alimentos contaminados que possam conter o triatomíneo, fezes ou urina do inseto. Ex: cana de açúcar, açaí.
Sexual	Ocorrência em indivíduos na fase aguda da doença que mantenham relações sexuais com eventual exposição ao sangue.
Acidentes laboratoriais	Profissionais da área da saúde podem ser infectados através de material perfurocortante contaminado e/ou manuseio de animais utilizados em para pesquisa e diagnóstico da DC.
Manuseio de animais infectados	Indivíduos que manipulam carcaça de animais infectados durante procedimentos de diagnóstico.

Fonte: autores 8-11.

Na DC são descritas duas fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda inicia-se em um intervalo de tempo entre oito a 10 dias após a infecção pelo parasito, e possui como característica, a alta parasitemia, tanto na corrente sanguínea, quanto nos tecidos do indivíduo (11-12). Pacientes neste período, apresentam desde sinais clássicos, como chagoma de

inoculação e/ou sinal de Romana, até sintomas mais graves como derrame pericárdico, meningoencefalite e/ou miocardite aguda. O diagnóstico confirmatório ocorre através da realização de pelo menos dois exames parasitológicos diretos ou testes sorológicos, nos casos em que a pesquisa a fresco pelo parasito for negativa (13-14).

A parasitemia apresenta-se elevada nesta fase que perdura por aproximadamente dois meses. Após este estágio, pode ocorrer um intervalo de latência de 10 a 15 anos, denominado como fase crônica assintomática. Neste período, o paciente desenvolve a forma indeterminada da doença com ausência de sintomas clínicos. Após a cronificação da DC, o diagnóstico é realizado por meio de testes sorológicos de maior sensibilidade, como imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, Hemaglutinação Indireta (HAI), podendo ainda ser realizado teste molecular, como Polymerase Chain Reaction (PCR). Alguns indivíduos nesta fase, apresentam uma queda na qualidade e tempo de vida, com possibilidade de aumento da ocorrência de morbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, obesidade e a progressão do risco cardiovascular (15).

Por fim, há pacientes que evoluem para a fase crônica sintomática, apresentando formas clínicas da doença: a forma cardíaca (considerada a mais frequente, acometendo cerca de 30% dos infectados e apresenta manifestações como miocardite crônica, insuficiência cardíaca, arritmia); forma digestiva (com típico megaesôfago e megacólon) ou forma mista (ambos sintomas cardíacos e digestivos são observados) (8, 16-19).

Pacientes chagásicos com a forma indeterminada normalmente são pacientes ambulatoriais, pois mesmo sem sintomatologia específica, estes indivíduos demandam atenção e cuidados frequentes, já que a cada ano de 2 a 5% evolui para DC sintomática e destes, de 30 a 40% progridem para complicações cardíacas e gastrointestinais (20).

Do total de sintomáticos, apenas de 10 a 30% apresentam distúrbios cardíacos decorrentes à infecção crônica pelo *T. cruzi* geralmente desenvolvendo arritmias ou cardiomiopatias (21-22), podendo citar ainda a ocorrência da HAS, que incide mais frequentemente entre os cardiopatas descompensados, a partir da quarta década de vida, reforçando o caráter progressivo somatório da DC, sugerindo que a tanto a DC quanto a HAS, podem agravar o quadro do paciente, já que ambas moléstias ocorrem concomitantemente (23).

A HAS é classificada como uma condição clínica com alta prevalência, acometendo cerca de um bilhão de pessoas em todo mundo nos últimos 30 anos, sendo denominada também como uma condição clínica multifatorial, cujos níveis pressóricos possuem valores de 140mmHg para a pressão sistólica e 90mmHg para a diastólica (24-25). Em pacientes chagásicos, a ocorrência

e o grau de gravidade da HAS, dependem da raça, sexo, idade, forma clínica da doença, peso, associação a insuficiência cardíaca, dentre outras variáveis (26-27).

Devido à alta prevalência tanto da DC no continente americano quanto da HAS, descrita como uma de suas principais complicações cardiovasculares, em um contexto mundial, essa enfermidade torna-se de importância significativa para a saúde pública brasileira. Portanto, informações no que se refere sobre suas correlações fisiopatológicas são de extrema importância, devendo assim serem disseminadas tanto entre os profissionais da saúde, quanto entre a população em geral (21).

Há uma escassez no que diz respeito a explicações acerca da relação entre essas duas patologias tão significativas. Neste sentido, algumas hipóteses podem ser levantadas, baseadas nos dados obtidos durante as buscas realizadas por alguns autores: A primeira delas descreve a HAS como um fator de risco para a DC, e não como uma complicação decorrente da tripanossomíase. Logo, indivíduos hipertensos, que residem uma zona de risco para contrair a DC, estariam mais propensos a apresentar complicações cardiovasculares, com possível evolução para cardiomiopatia crônica com um pior prognóstico (28-29).

Todo esse processo envolvendo HAS e DC ocorre devido a fisiopatologia de ambas possuir denominadores em comum e contribuir para um quadro clínico de inflamação sistêmica, com amplo acometimento tissular, resultando na destruição das fibras do músculo miocárdico, sucedendo na dilatação do ventrículo e na insuficiência cardíaca (30-31). Pacientes hipertensos chagásicos, normalmente apresentam dispneia, fadiga e edema de membros inferiores (32).

Já a segunda condição aponta a HAS como uma consequência da DC, ou seja, a HAS se torna mais frequente em indivíduos chagásicos, e que apresentam predisposição a desenvolver complicação cardiovascular (27-28). A justificativa para esse comprometimento, é o fato da destruição de fibras nervosas parassimpáticas e em menor impacto, as simpáticas, durante a infecção pelo *T. cruzi* (33-34), resultando na desregulação neurovegetativa com predomínio do tônus simpático, levando ao aumento dos níveis da pressão sanguínea e, conseqüentemente a HAS (35).

O fato da persistência e instalação da infecção crônica causada pelo parasito, indica que o próprio possui inúmeros mecanismos de escape do sistema imunológico. No interior do hospedeiro, durante a fase aguda, a resposta imune ocorre intensamente, diminuindo assim a parasitemia tanto circulante quanto tecidual (36-37). Devido a este desequilíbrio na homeostasia, as células hospedeiras de defesa se utilizam de mecanismos para combater o agente infectante, a partir da ativação do sistema imunológico, envolvendo diversos tipos celulares e mediadores (38).

A resposta imune inata e adquirida são as responsáveis por desempenharem essa função e durante a replicação intracelular do parasito, este libera antígenos exógenos e endógenos que iniciarão uma cascata inflamatória (39-40).

Aspectos como as características das cepas do agente infectante, juntamente com resposta imunológica do indivíduo acometido pela DC, a carga genética do paciente e do parasita além de patologias relacionadas, são determinantes na evolução dos sintomas clínicos ou na ausência deles. As comorbidades neste sentido podem interferir na evolução da DC e na qualidade de vida destes indivíduos. As comorbidades frequentemente estudadas são hipertensão arterial sistêmica e/ou doenças cardiovasculares, obesidade, hipercolesterolemia, hiperglicemia, hipovitaminose D e saúde óssea debilitada (16-41).

Tanto a DC quanto a HAS, são moléstias de caráter grave e que em alguns casos resultam em morte, além de reduzir a qualidade de vida dos indivíduos, causando ainda um impacto na saúde pública. A tripanossomíase americana é considerada uma doença responsável por causar incapacidade, reduzir a expectativa de vida e/ou levar ao óbito, especialmente em pacientes adultos jovens, além disso, é descrita como um fator de risco autônomo para doenças vasculares isquêmicas, como é o caso da HAS (23-42).

1.2 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO SIMPLES (SNP)

Aspectos genéticos são alvos de estudos sobre a relação parasita-hospedeiro e suas gravidades. Neste sentido há o Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNPs) associado a diversas doenças em diversos genes associados à DC. Um dos genes que possa relacionar as comorbidades e infecção é o gene da Angiotensin converting enzyme (*ACE 2*), que de algum modo está associado a doenças, como a hipertensão, por exemplo, interferindo assim no balanço tênue da proteção e lesão dos tecidos na DC (43-45).

Cerca de 90% das variantes de sequência em humanos são diferenças em bases únicas de DNA, chamados SNPs. Os SNPs são uma fonte comum de variação genética dentro do DNA genômico, sendo nos dias de hoje o marcador de escolha por estar presente em grande número em praticamente todas as populações de indivíduos, apresentando frequência de mais de 1% na população humana. Normalmente conferem uma diferença de nucleotídeo único dentro de um *locus* de gene específico, resultando em dois alelos do gene. Quando presentes em regiões codificadoras ou regulatórias de um gene, esses polimorfismos podem afetar a função ou, mais comumente, servir como marcadores biológicos para a herança de um loci específico (46-48).

O emprego destes marcadores foi notadamente demonstrado na genômica humana, já que o sequenciamento completo do genoma humano resultou na descoberta de milhões de SNPs,

seguido de desenvolvidas tecnologias para analisar conjuntos de até um milhão de polimorfismos de nucleotídeo único (49).

Habitualmente esses polimorfismos são bi alélicos, não descartando a possibilidade de raramente identificar formas tri ou tetra alélicas, podendo ser encontrados em média, um a cada 1000 pb (50-51). A periodicidade com que os SNPs variam inúmeras vezes em locais diferentes do DNA, se caracteriza pelo fato de não serem igualmente distribuídos. Em suma, os SNPs ocorrem mais raramente em regiões codificantes do DNA do que em regiões não codificantes (52-53).

Polimorfismos detectados em regiões não codificantes mesmo não alterando proteínas codificadas, desempenham um papel importante como marcadores tanto genéticos quanto físicos com o intuito de auxiliar nos estudos de genômica evolutiva ou comparativa e quando identificados nos sítios regulatórios de um gene, podem impactar nas taxas de transcrição, alterando a produção da proteína codificada. Já em sítios codificantes, os SNPs podem alterar a estrutura da proteína e consequentemente a sua função, desencadeando o desenvolvimento de doenças ou alterações frente a uma resposta a determinada droga ou toxina ambiental (49,54).

O polimorfismo no gene *ACE 2* tem como característica uma troca das bases C por T na região cromossômica 15566297. Essas trocas podem refletir no controle da pressão sanguínea. O gene *ACE 2* está ligado ao cromossomo X, refletindo na herança materna. Tanto fatores genéticos quanto ambientais favorecem para o risco de doença arterial coronariana (DAC). Polimorfismos comuns em diferentes genes já foram relatados como condições de risco genéticos para DAC. Os polimorfismos da *ACE2*, têm sido associados à hipertensão em diferentes indivíduos e estas alterações no gene desta enzima têm sido associados a um aumento no risco de hipertensão (55).

Há uma possibilidade de que o portador de determinados polimorfismos no gene *ACE 2* pudessem manifestar previamente uma doença quando comparado aos demais portadores com outros genótipos (55). Assim como ocorre na COVID-19 em que há possível envolvimento de fatores genéticos relacionados ao gene *ACE 2* na patogênese da doença, que foi apoiado pela identificação de marcadores polimórficos no locus *ACE2* e estão presentes em pacientes com comorbidades, como por exemplo: HAS, diabetes, obesidade, sendo relacionadas à gravidade do COVID-19. Deste modo, demonstrou-se que a proteína ACE2 desempenha um papel importante na proteção contra alguns distúrbios, como complicações cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e diabetes, entre outras comorbidades da COVID-19 (40,46).

1.3 GENE *ACE 2*

Tipnis e cols., apresentaram pela primeira vez uma protease clonada de uma livraria de cDNA de células adquiridas de um paciente com linfoma. Pelo fato de a sequência genômica possuir inúmeras semelhanças em sua estrutura com o gene da *ACE* humana, nomearam-na *ACEH* (*angiotensin converting enzyme homology*) ou *ACE2*.

O gene *ACE2*, responsável por regular a função da enzima *ACE 2* foi mapeado em seres humanos no cromossomo X p22.2 e é constituído por 18 éxons e 17 íntrons, organizado de maneira semelhante (Figura 2) ao tamanho dos éxons do gene *ACE* e apresenta aproximadamente 40 KB de DNA genômico. A enzima *ACE 2* é considerada como uma das descobertas mais importantes da história do sistema renina angiotensina (SRA) pois sabe-se que grande parte das doenças cardiovasculares coincide traços quantitativos multifatoriais, coordenados por fatores genéticos e ambientais (56-57).

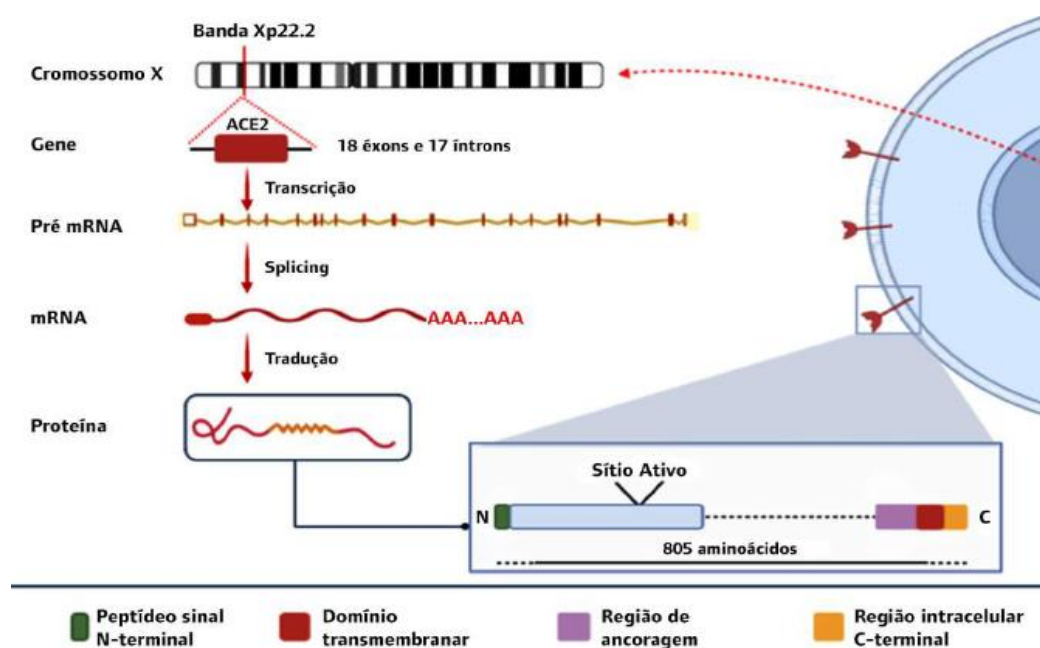


FIGURA 2-Localização e características do gene *ACE 2*.

Fonte: Rev. Genética na escola.vol.16. n: 2; 2021.

A partir de observações experimentais é possível afirmar a hipótese de que o gene *ACE2* poderia estar relacionado com o controle sistêmico da pressão arterial e em parâmetros no que diz respeito à função de contração do coração (57). Segundo Crackwover e cols., ao utilizarem quatro abordagens experimentais variadas, demonstraram a minuciosidade da função reguladora da *ACE2* sobre as funções de contração cardíaca e de controle dos níveis pressóricos. Inicialmente detectaram que modelos de ratos hipertensos sódio-sensíveis

possuíam níveis baixos de RNAm da enzima (ACE2) quando comparados aos animais normotensos e sódio resistentes. Posteriormente, constataram que a expressão da ACE2 se manteve constantemente reduzida em outros modelos experimentais de hipertensão, como nos roedores naturalmente hipertensos e nos animais espontaneamente hipertensos predispostos a acidente vascular encefálico.

Estudos apontam que esta enzima possui relação com as respostas às doenças isquêmicas cardíacas e função de balancear a atividade da ACE 1. Trata-se de uma metaloproteinase descoberta em humanos e roedores responsável em clivar angiotensinas (59).

Podendo ser encontrada principalmente em tecidos renais e cardiovasculares, a ACE 2 possui 805 aminoácidos em sua estrutura, incluindo uma sequência N-terminal e um único sítio catalítico, características essas que correspondem a 42% de semelhança com a conhecida ACE1, com diferenças somente em relação à especificidade de substrato e o fato de sua atividade não ser modificada pelos inibidores classicamente conhecidos da ACE1. A expressão da ACE2 no sistema cardiovascular acontece principalmente nas células do endotélio arterial, arteríolas e vênulas tanto do coração, quanto do rim. Além destes órgãos, a ACE2 foi também descrita como presente no trato gastrointestinal de seres humanos e no pulmão de camundongos (60).

No sistema cardiovascular, a ACE2 atua clivando a *Angiotensina I* com posterior geração de peptídeo que até o momento era considerado inativo *Angiotensina 1-9*, e que posteriormente pode ser transformado em *Angiotensina 1-7* e essa por fim pode ser inativada pela ACE somática ou outras peptidases, resultando em um resíduo inativo *Angiotensina 1-5* (59-60).

A ACE 2 pode ainda metabolizar de maneira direta a *Angiotensina II*, gerando como produto *Angiotensina 1-7*. Tanto a *Angiotensina 1-9* quanto a *Angiotensina 1-7* não podem ser hidrolisadas pela ACE2. Assim sendo, esse comportamento sugere ser a ACE2 a principal via de formação da *Angiotensina 1-7* juntamente com a *Angiotensina II* (1). A função exercida pela *Angiotensina 1-7*, é a vasodilatação, traduzindo em efeitos benéficos como anti-hipertensivo e indicando que o equilíbrio entre ACE1 e ACE2 tem função na manutenção da homeostasia no organismo (59-60) (Figura 3).

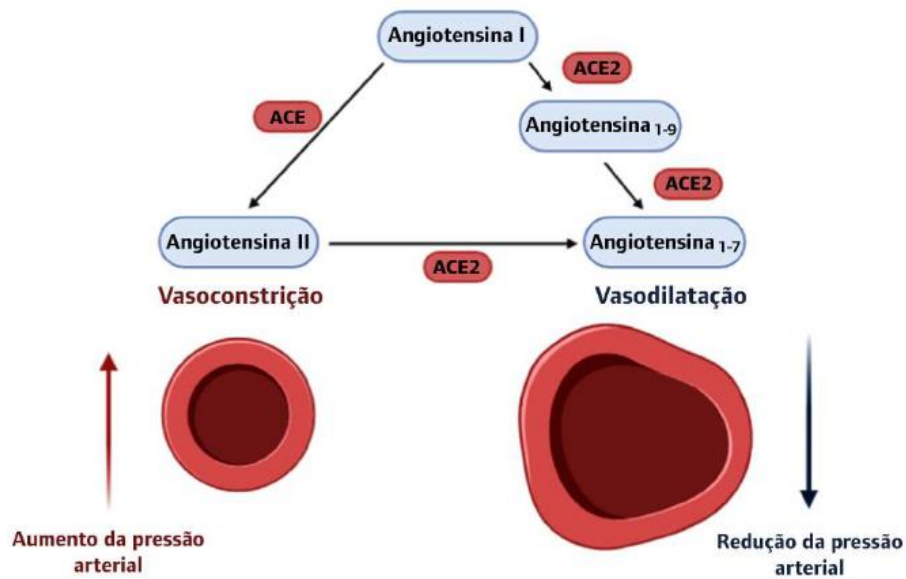


FIGURA 3- Atuação da ACE 2 no controle dos níveis pressóricos.
 Fonte: Rev. Genética na escola.vol.16. n: 2; 2021.

Deste modo a *ACE2*, possui papel na função cardíaca e no desenvolvimento de comorbidades como a hipertensão, sendo esse, fator de risco regularmente observado em indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica.

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam na literatura inúmeros estudos descrevendo a patogênese da DC, a minoria deles busca esclarecer o motivo pelo qual um grupo de pacientes infectados permaneceu assintomático, enquanto outros apresentaram sintomatologia mais grave da DC. Deste modo, alguns autores apontam que este fato possa estar associado com a resposta inflamatória, com os mecanismos imunes responsáveis pela eliminação do parasita e até mesmo pela relação genômica entre o hospedeiro e o parasita.

Na fase crônica, um dos argumentos mais instigantes é a circunstância que leva os pacientes a desenvolverem distintas manifestações clínicas; não se tem conhecimento sobre o principal fator responsável que contribua para o aparecimento dos sintomas clínicos da DC. A predisposição genética humana e marcadores moleculares, integram potenciais alvos para explicar a vulnerabilidade em algumas infecções.

Considerando que o polimorfismo da *ACE2* possa contribuir com a piora da DC, principalmente em pacientes portadores com a forma cardíaca, decidimos verificar as frequências do polimorfismo rs: 2074192 do gene *ACE2* em dois grupos de pacientes com DC e suas associações com as comorbidades, principalmente a hipertensão.

3. OBJETIVO

Avaliar o polimorfismo do gene *ACE2* para o *rs2074192* em pacientes com duas formas clínicas da fase crônica da doença de Chagas, indeterminada e cardíaca e correlacionar a forma clínica com o SNP para o *rs2074192*, hipertensão, obesidade, dislipidemia e hiperglicemia.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os pacientes do ambulatório de doença de Chagas foram convidados a participar do estudo, com posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). As amostras de DNA obtidas foram armazenadas e analisadas em conjunto para o presente estudo “Polimorfismos do gene ACE2”. Os dados clínicos analisados, foram coletados dos prontuários eletrônicos.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 PACIENTES E GRUPOS

O presente estudo observacional descritivo, analítico e retrospectivo, foi conduzido por meio da seleção dos pacientes atendidos desde 2003 no Ambulatório de Moléstias Infecciosas Geral, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP: Foram incluídos 64 indivíduos sorologicamente reagentes para DC, procedentes das sub-regiões de Avaré, Botucatu, Bauru, Itapeva, Itapetininga, Ourinhos e Sorocaba. Do total de pacientes, 46 apresentaram forma indeterminada da DC e 18 apresentaram a forma cardíaca da doença. A inclusão somente das duas formas ocorreu com o intuito de conseguirmos comparar apenas um tipo de lesão em um determinado órgão, no caso o coração.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no presente estudo, somente pacientes adultos do sexo masculino, que participaram do estudo prévio, parecer nº 1.576.662, no qual assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e os mesmos concederam a utilização das amostras biológicas para estudos posteriores, semelhantes ao conduzido pelo estudo clínico citado.

Os portadores classificados com a forma indeterminada, foram os pacientes que apresentaram sorologia positiva em pelo menos dois métodos (quimioluminescência, hemaglutinação ou imunofluorescência indireta) e com eletrocardiograma (ECG), enema opaco e esôfago-estômago-duodeno normais e ausência de sintomas clínicos.

Já os portadores da forma cardíaca, foram os indivíduos que, além de sorologias positivas, apresentavam alterações no ECG, radiografia de tórax e sintomas clínicos como palpitações, arritmias, incluindo extrassístole ventricular, taquicardia e diferentes graus de bloqueios cardíacos.

Dentre os dados clínicos retirados do prontuário médico, estavam: idade (anos); peso (Kg), altura (m), IMC, drogas para hipertensão, dislipidemia e hiperglicemia de uso do paciente, pressão diastólica e sistólica, valores de colesterol e frações, valores de glicemia.

O IMC foi calculado por meio da fórmula $\text{peso (Kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$ e a classificação do estado nutricional dos valores ocorreu de acordo a Organização Mundial de Saúde (OMS) para os indivíduos com idade inferior a 60 anos: Eutrofia (IMC entre 18,5 e 24,9), Sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9), Obesidade I (IMC entre 30,0 e 34,9) e Obesidade II (IMC entre 35,0 e 39,9) (61). Para os indivíduos com idade ≥ 60 anos o estado nutricional foi classificado como:

Magreza (IMC < 22,0), Eutrofia (IMC entre 22,0 e 27,0), Sobrepeso (IMC > 27,0) e Obesidade (IMC > 30,0) (62).

Para a classificação da gravidade das comorbidades: diabetes, colesterol total; HDL e triglicerídeos, foram considerados os seguintes valores nos exames bioquímicos: Glicemia > 200 mg/dL; Colesterol total > 239 mg/dL, HDL normal entre 40 mg/dL e 60 mg/dL, Triglicerídeos > 200 (63-64) (Tabela 2), além da avaliação dos medicamentos de uso contínuo para o controle dessas comorbidades.

TABELA 2- Valores de referência dos exames bioquímicos em amostras de sangue.

TIPO DE EXAME BIOQUÍMICO	VALORES DE REFERÊNCIA
Glicose	Valores
Normal	< 100 mg/dL
Alterado	100 a 125 mg/dL
Glicemia aumentada	126 a 199 mg/dL
Diabetes Mellitus.	> 200 mg/dL
Colesterol total	Valores
Desejado	< 200 mg/dL
Limite	200 a 239 mg/dL
Aumentado	> 239 mg/dL
HDL	Valores
Normal	40 a 60 mg/dL
Triglicérides	Valores
Desejado	< 150 mg/dL
Limite	150 a 199 mg/dL
Aumentado	200 a 499 mg/dL
Muito aumentado	> 499 mg/dL

A dosagem dos níveis de glicemia, colesterol e frações, foi realizada por técnica de química seca, no analisador Vitros[®]. < = menor; > = maior; mg = miligramas; dL=decilitros. Fonte: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

A hipertensão sistólica isolada foi definida como pressão arterial sistólica $\geq$ 130 mmHg de diastólica < 80 mmHg, e a hipertensão diastólica isolada é definida como pressão arterial sistólica < 130 mmHg e diastólica $\geq$ 80 mmHg e uso de medicamentos para hipertensão (65).

Foram considerados pacientes hipertensivos, os indivíduos com pressão sistólica entre 130 a 139 mmHg ou diastólica entre 80 a 89 mmHg (estágio 1) ou sistólica de pelo menos 140 mmHg ou diastólica de pelo menos 90 mmHg (estágio 2).

Na prática clínica, os pacientes que estão tomando medicamentos para hipertensão arterial sistêmica são geralmente definidos como portadores de hipertensão, especificamente “hipertensão tratada”, independentemente da pressão arterial observada. Definições baseadas em leituras ambulatoriais e domiciliares, são de suma importância no diagnóstico de hipertensão, que requer a integração da monitorização domiciliar ou ambulatorial da pressão arterial, enquanto as medições de rotina feitas no ambiente clínico devem ser usadas principalmente para fins de detecção.

5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes com síndrome genética e má formação; pacientes do sexo feminino que em decorrência do gene *ACE2* estar localizado no cromossomo X, a identificação do polimorfismo necessitaria ser realizada nos dois cromossomos XX de origem materna e paterna. O sexo feminino também foi excluído devido ao uso de contraceptivos orais que aumentam a pressão sanguínea, podendo desencadear hipertensão arterial sistêmica induzida por medicamento; materiais biológicos que estavam inviáveis para o presente estudo; pacientes que se recusaram a participar; falecidos ou indivíduos com dados pessoais incorretos.

5.4. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP (Anexo 1). O consentimento para participação no trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos do estudo prévio, com posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

5.5. MÉTODOS

5.5.1 *Coleta de sangue periférico*

Foram utilizadas amostras já coletadas. A obtenção desse material biológico ocorreu da seguinte maneira: Foi coletado 5 mL de sangue periférico de cada um dos indivíduos chagásicos crônicos e após centrifugação de 15 minutos a 15000 rpm foi realizada a separação da papa leucocitária. Para o estudo, foi adicionado 1mL de tampão de lise de células vermelhas - RCLB (pH: 7,6 1X: 10mM de Tris; 5mM de MgCl₂ e 10mM de NaCl) e realizada a centrifugação a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado em temperatura -20°C.

5.5.2 *Extração de DNA Genômico*

Para a determinação do polimorfismo, o DNA genômico foi isolado a partir de leucócitos do sangue venoso periférico utilizando o Kit PureLink® Genomic DNA Mini Kits K182001 (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi mantido em freezer -80°C até a realização das análises. A quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare®, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). O SNP no gene *ACE2* foi selecionado conforme Zhimin, F et al. (2019) (Anexo 3-4-5-6-7).

5.5.3 Reação em Cadeia da Polimerase para os SNPs

A amplificação de todos os SNPs pela PCR foi realizada em um volume de 25 µL contendo 50 ng de DNA genômico, água Mili-Q, tampão, 3,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada de dNTP, 20 pM de cada primer e 1U de Taq DNA Polimerase (Cellco®, São Carlos, Brasil) e as condições das reações de padronização foram 17,5 uL de H₂O; 2,5 µL de *Buffer*; 0,75 µL de MgCl₂ (50mM); 0,5µL de dNPTs (10µM); 0,25 µLde Taq (5U/µL); 0,5 µL de P1 (15 pmoles); 0,5 µL de P2 (15 pmoles); 2,5 µL de DNA (67).

As temperaturas utilizadas foram baseadas de literatura descrita e ocorreu da seguinte maneira: 1ª etapa- 95°C por 5' para desnaturação; 2ª etapa- 95°C por 30'' para desnaturação; 3ª etapa-62°C por 30'' para anelamento do primer; 4ª etapa-72°C por 1'30'' para extensão; Repetição das etapas 2 a 4 por 35 vezes; 5ª etapa- 72°C por 10' para extensão e 6ª etapa- 4°C para estocagem da amostra.

Todos os produtos de PCR foram monitorados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com 1 µL de brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta (UVP, Upaland, CA, USA) para confirmação da amplificação de uma banda única.

Os polimorfismos do gene *ACE 2* utilizando a PCR e sequenciamento foram descritos por Fan et al (2019). Um produto de aproximadamente 500 bp foi gerado usando o *primer forward* 5'- GTA AGC CAT TTC CCA TCC C-3' e o *primer reverse* 5'- ATT GTG CCA CTG CCC TCT A-3', sendo sequenciado posteriormente pelo método de Sanger.

5.5.4 Genotipagem do SNP rs 2074192 - Sanger

O sequenciamento ocorreu após amplificação do material por meio da PCR, utilizando os primers já descritos na literatura por Fan et al., 2019: Forward: 5'- GTA AGC CAT TTC CCA TCC C-3'; Reverse: 5'- ATT GTG CCA CTG CCC TCT A-3'. O primer foi verificado no site NCBI. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações.

A reação de sequenciamento foi realizada em volume total de 10 µL, contendo 1,5 µL do tampão de sequenciamento; 10 pmol do primer (os mesmos utilizados nas reações de PCR), 1 µL de Big Dye, 60 a 90 ng de produto de PCR purificado e água MilliQ q.s.p.. Seguindo as instruções do manual da Applied Biosystems, a reação foi precipitada com

etanol/EDTA/Acetato, e após ressuspensão em formamida Hi-Di (Applied Biosystems), submetida à corrida em eletroforese capilar no equipamento “3500 Genetic Analyzer”.

A análise inicial foi realizada no programa Sequencing Analysis (Applied Biosystems), que aponta os prováveis polimorfismos encontrados e associa a cada base um valor de qualidade (QV). Foram aceitas somente as sequências com QV igual ou superior a 20, correspondente a 1% de probabilidade de erro. Após essa análise inicial, a sequência consenso das duas fitas foi obtida no programa BioEdit v.7.2 e analisada após alinhamento com uma sequência de referência, utilizando a ferramenta Blastn.

5.5.5 Comparação do Amplicon com o gene ACE 2 publicado no banco de dados público Blast

Recorremos a ferramenta de comparação entre sequências primárias (nucleotídeos ou aminoácidos) que utiliza um algoritmo de programação dinâmica para alinhamento local, BLAST e que apresenta uma metodologia de grande eficiência para comparação par-a-par entre sequências, quanto a comparação de uma sequência com uma grande base de dados. Para tal, utilizamos a ferramenta BLASTn (n= nucleotídeo), que por sua vez permite comparar uma sequência de nucleotídeos com uma base de dados de sequências de nucleotídeos.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados qualitativos foram selecionados dois diferentes testes: qui-quadrado ou Teste Exato de Fischer, dependendo dos valores dos dados nas tabelas de contingência.

Para os dados quantitativos foram selecionados os testes de análises paramétricas ANOVA e teste-t de Student para variáveis com distribuição normal; para as variáveis com distribuição assimétrica, foram eleitos os testes de Mann-Whitney. Foram consideradas diferenças significativas entre os grupos para valores onde $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

O estudo incluiu inicialmente 64 pacientes. Desse total, foram excluídos 16 indivíduos, dentre eles: Sete foram excluídos por mudança de forma clínica; um se recusou a participar do estudo; seis foram excluídos por insuficiência de material biológico e dois foram a óbito, resultando em um número final de participantes do estudo, $n = 48$.

Procedentes de diferentes localidades do estado de São Paulo, os indivíduos do presente estudo, estavam distribuídos de acordo com a figura 4 e 5.

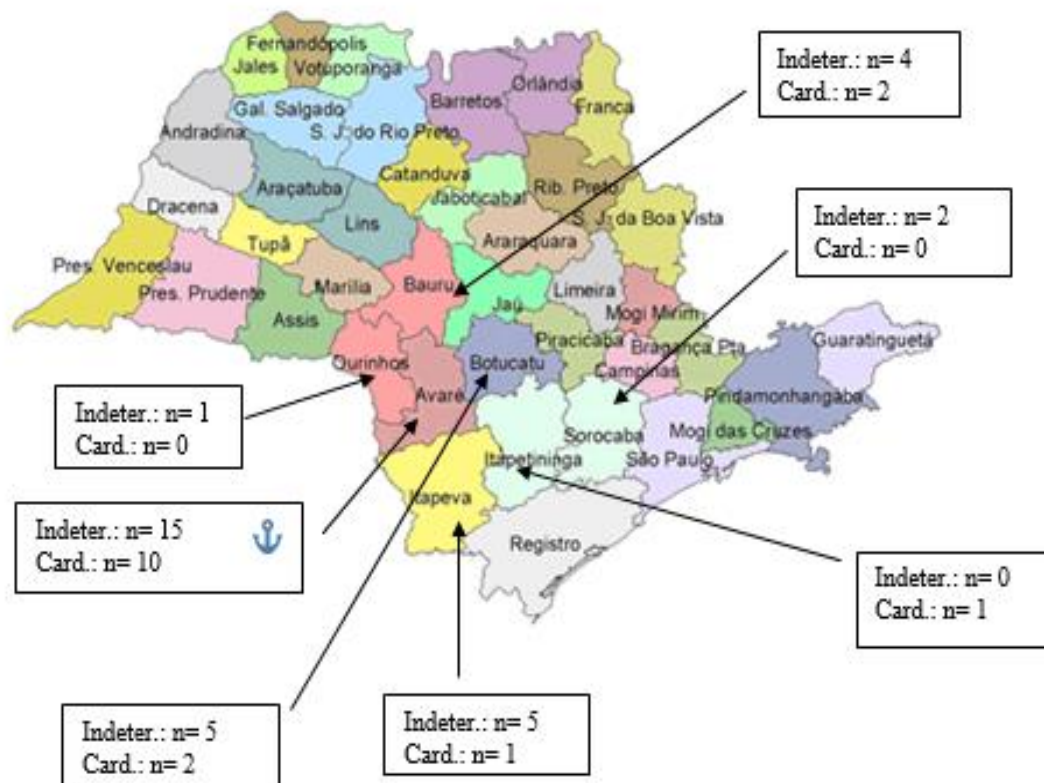


FIGURA 4: Mapa da procedência dos pacientes com doença de Chagas no Estado de São Paulo atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Indeter = Forma indeterminada; Card = Forma cardíaca; n= Número de pacientes pertencentes a cada sub-região. Fonte: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/mapa.ph> - Modificado por Daniela Filadelfo Sanches

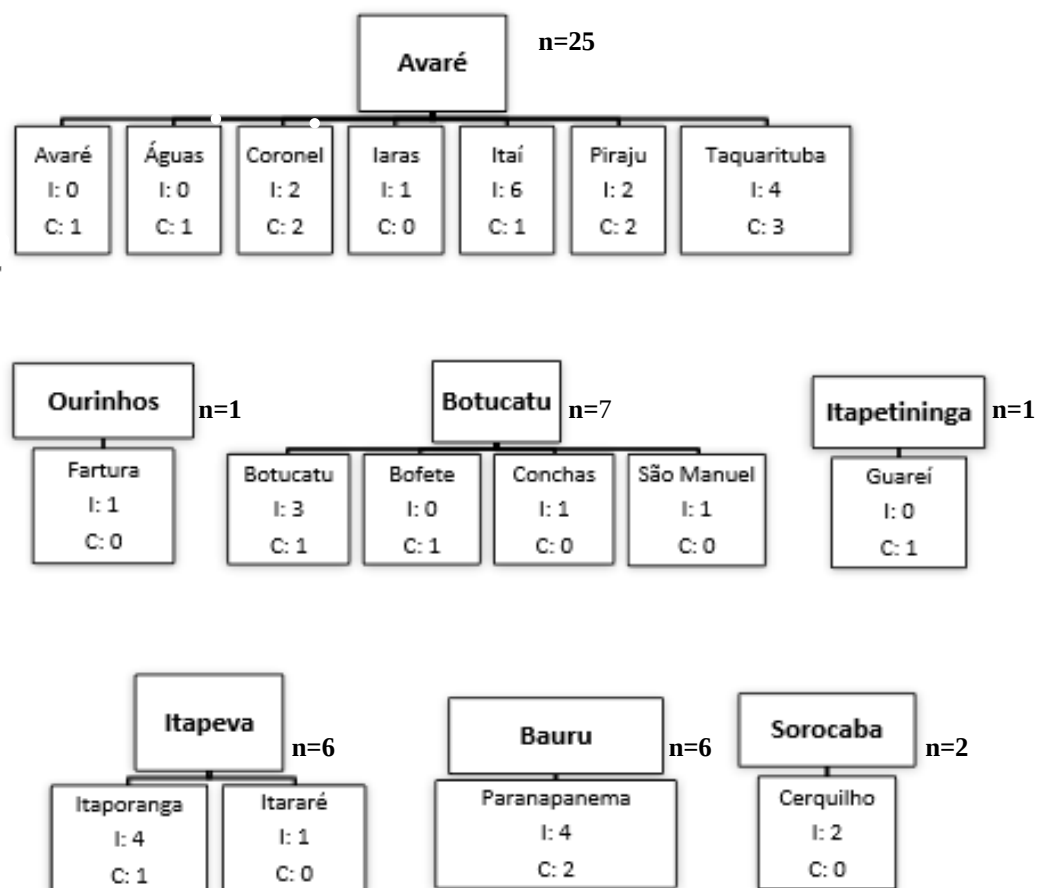


FIGURA 5: Fluxograma da procedência dos pacientes com Doença de Chagas no Estado de São Paulo atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. I = Forma indeterminada; C = Forma cardíaca. N=número de pacientes pertencentes a cada sub-região. Fonte: <http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/out/mapa.ph> - Modificado por Daniela Filadelfo Sanches.

O maior número dos pacientes residia em cidades da sub-região de Avaré, representando 52% (n=25) do total dos 48 pacientes, e 48% compreenderam pacientes procedentes das outras regiões.

Os chagásicos indeterminados na sub-região de Avaré, representaram 46,8% (n=15) do total 32 pacientes com essa forma clínica e com a forma cardíaca, o percentual foi de 62,5% (n=10) do total de 16 pacientes.

A cidade com o maior número de pacientes com a forma indeterminada foi Itai, pertencente à sub-região de Avaré, com o percentual de 18,7% (n=6). O maior número de indivíduos com a forma cardíaca foi do município de Taquarituba, pertencente a mesma região, com o percentual de 18,7% (n=3).

Os valores do IMC, colesterol e frações, glicemia e pressão arterial não diferiu entre os dois grupos. Isto é decorrente do seguimento ambulatorial propiciado no Ambulatório de Doenças Tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. As comorbidades são diagnosticadas e tratadas no decorrer do acompanhamento do paciente chagásico (Tabela 3).

TABELA 03- Média e desvio padrão das características clínicas e exames laboratoriais dos pacientes com doença de Chagas com as formas clínicas indeterminada e cardíaca atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Variáveis	Forma indeterminada (Média e Desvio Padrão)	Forma cardíaca (Média e Desvio Padrão)	Valor de p
Idade (anos)	64,94±7,73	66,19±9,29	0,81
Peso (kg)	76,10±12,10	75,86±13,49	0,99
Altura (m)	1,69±0,06	1,70±0,06	0,77
IMC (kg/m²)	26,98±3,92	26,40±4,12	0,84
Colesterol total (mg/dL)	166,38±31,84	168,75±37,91	0,33
HDL (mg/dL)	49,94±13,75	47,62±17,28	0,61
Triglicerídeos (mg/dL)	121,77±55,55	112,53±42,97	0,94
Glicemia (mg/dL)	108,88±32,48	107,44±28,24	0,72
Pressão arterial (mmHg)			
Máxima	13,00±1,32	13,37±1,45	0,37
Mínima	8,19±0,86	8,69±0,95	0,13

Teste paramétrico empregado: Teste t de Student que permite comparar duas médias quando dados assumem uma distribuição normal. Fonte: De autoria própria.

A idade dos 48 participantes ficou em torno dos 64 e 66 anos, concluindo que nosso grupo de indivíduos são pacientes idosos. Não houve diferenças estatísticas entre as médias e desvios calculados entre os dois grupos.

Nos dois grupos, houve maior número de indivíduos brancos, representando um total de 29 (90%) com a forma indeterminada e 13 (81,2%) com a forma cardíaca, do total de 48 pacientes.

As comorbidades avaliadas não apresentaram diferenças entre os grupos, mesmo a hipertensão sistêmica, não houve diferença de frequência entre cardíacos e indeterminados. (Tabela 4).

TABELA 04- Comorbidades e etnia em pacientes com as formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Variáveis	Forma Indeterminada; n (%) (n=32)	Forma Cardíaca; n (%) (n= 16)	Valor de p
Hipertensão	15 (46,9%)	12 (75%)	0,064
Obesos*	7 (22,6%)	3 (18,8%)	0,76
Hipercolesterolemia	16 (50%)	9 (56,3%)	0,68
Diabetes	9 (28,1%)	4 (25%)	0,82
Etnia branca **	29 (90,6%)	13 (81,3%)	0,33

Valores de p obtidos por meio dos testes de Qui-Quadrado e Exato de Fisher.

n= número de pacientes chagásicos com as formas indeterminada e cardíaca.

*A classificação nutricional dos indivíduos não obesos compreendeu pacientes com IMC < 30.

** Pacientes pardos e negros foram considerados não brancos. Fonte: De autoria própria.

Os números de pacientes com baixo peso foi de um para a forma indeterminada e três para a forma cardíaca, $p= 0,046$. O número de eutróficos foi de 15 para a forma indeterminada e três para a forma cardíaca, $p= 0,406$. Para os sobrepesos o número foi de 8 para a forma indeterminada e 7 para a forma cardíaca, $p= 0,126$; de obesos foi de 7 para a forma indeterminada e 3 para a forma cardíaca, $p= 0,634$, estas frequências de sobrepesos e obesos entre formas clínicas não mostraram diferença significativas.

Os medicamentos de uso contínuo para o tratamento da HAS, hipercolesterolemia, diabetes/hiperglicemia estão na Tabela 5. Estes medicamentos estavam nos prontuários eletrônicos e auxiliaram na identificação das comorbidades de cada paciente.

TABELA 05- Classe dos medicamentos utilizados para o tratamento de hipertensão, hipercolesterolemia, hiperglicemia nos pacientes com DC (doença de Chagas) em sua forma indeterminada e cardíaca atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Variáveis	Forma indeterminada e cardíaca (n=48)
Hipertensão	Bloqueadores de angiotensina II, Alfa bloqueador, Beta bloqueadores, Inibidores da ECA, Diuréticos
Hipercolesterolemia	Estatina
Diabetes /hiperglicemia	Biguanidas, insulina, Sulfonilureias, Inibidores da proteína de transporte de sódio-glicose

Forma cardíaca e indeterminada = forma clínica crônicas da DC; n= Número total de pacientes; ECA: Enzima conversora de angiotensina. Fonte: De autoria própria.

6.2 SEQUENCIAMENTO

6.2.1 Extração de DNA

As amostras de DNA foram extraídas a partir de 5 ml de sangue total apresentaram rendimento com valores entre 4 a 583,5 ng/uL. Apenas uma amostra apresentou rendimento de 4 ng/mL.

6.2.2 Produtos de PCR obtidos com o primer para o rs2074192 e purificação do amplicon

As amostras amplificadas com o primer de Zhimin Fan et al (2019) mostraram somente uma banda de amplificação de 500 bp, sem bandas duplas ou qualquer tipo de banda que pudesse sugerir duplo amplicon (Figura 6-7).

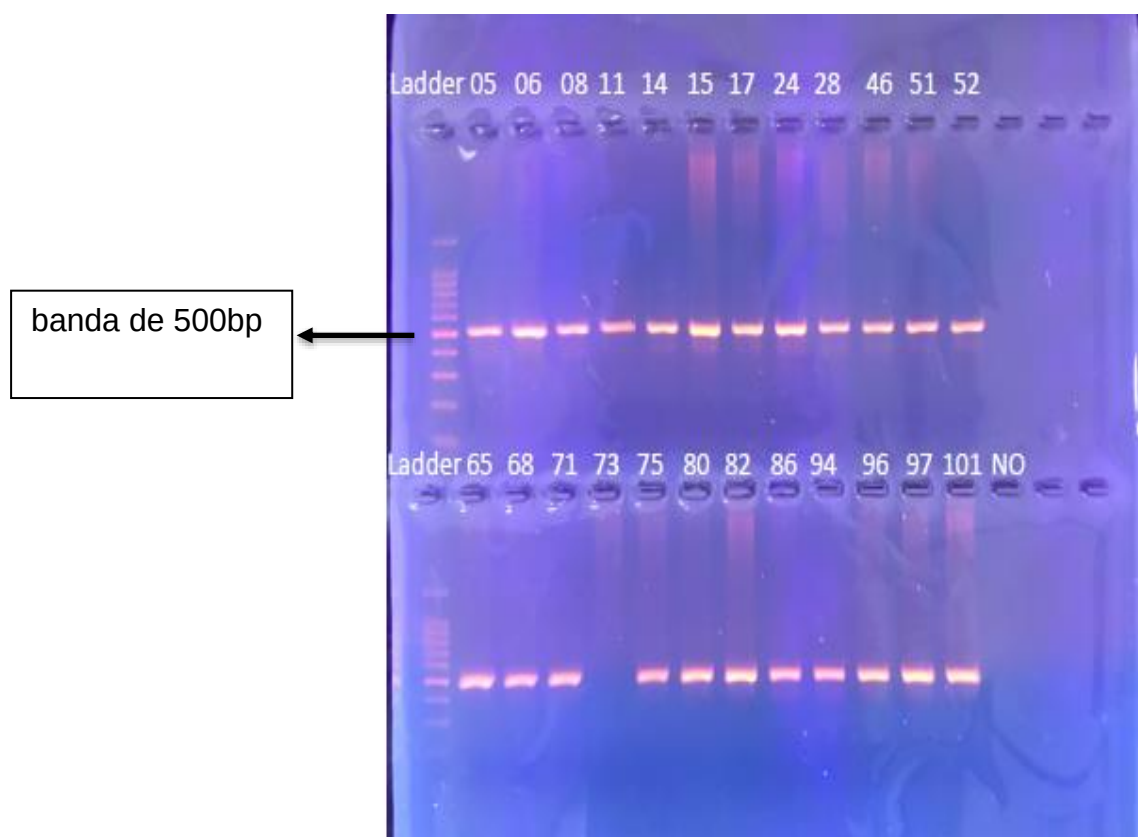


FIGURA 6 - Produtos de PCR obtidos de amostras de DNA extraído de pacientes com a forma crônica Indeterminada e cardíaca da doença de Chagas atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Primeira linha: 05; 06; 08; 11; 14; 15; 17; 24; 28; 46; 51; 54 Segunda linha: 65; 68; 71; 73; 75; 80; 82; 86; 94; 96; 97; 101; NO (amostra sem DNA/ controle negativo). Marcador de peso molecular Ladder de 100 bp (pares de base) - primeiro poço do gel.

Fonte: De autoria própria.

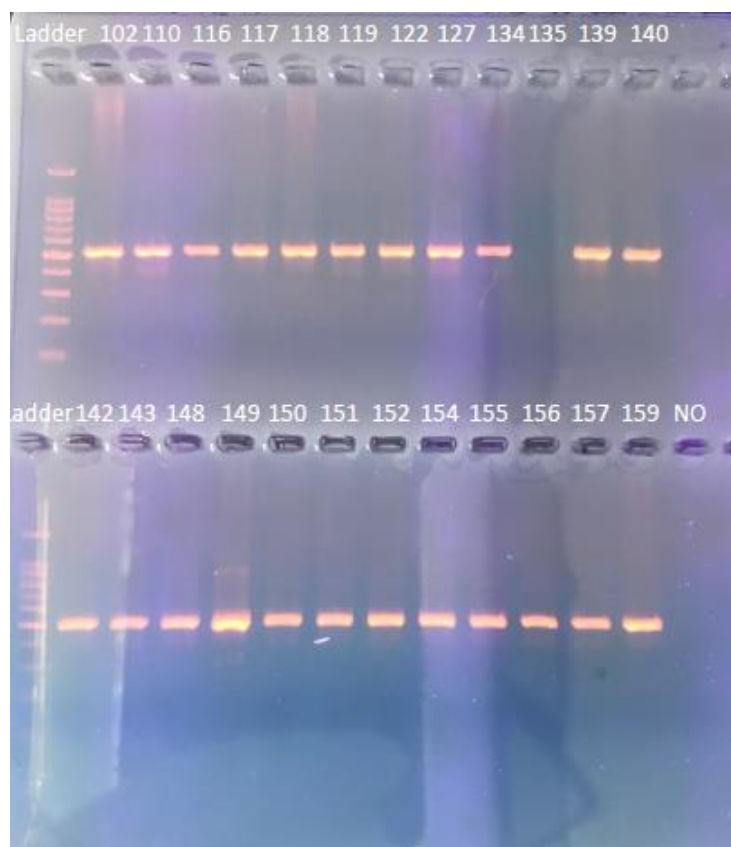


FIGURA 7 - Produtos de PCR obtidos de amostras de DNA extraído de pacientes com a forma crônica Indeterminada e cardíaca da doença de Chagas atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Amostras da Primeira linha: 102; 110; 116; 117; 118; 119; 122; 127; 134; 135; 139; 140. Segunda linha: 142; 143; 148; 149; 150; 151; 152; 154; 155; 156; 157; 159; NO (amostra sem DNA/ controle negativo). Marcador de peso molecular Ladder de 100 bp (pares de base) - primeiro poço do gel.

Fonte: De autoria própria.

Algumas amostras que não amplificaram na primeira vez da reação foram repetidas e a banda de 500 bp foi obtida. Amostras que não amplificaram na segunda reação de PCR foram descartadas pois continham erro de purificação, contaminantes que bloqueavam a reação ou ausência de material genético do paciente.

Os produtos de PCR apresentaram valores de concentração máxima=116,50, mínima =16,60, mediana = 55,50, p25= 44,37 e p75=70,87 µg/mL. Os valores para as razões de absorbância foram de 260/280, implicando na pureza do ácido desoxirribonucleioco ou ribonucleioco ou ainda contaminação por proteína foram de valor máximo= 1,882, mínimo = 1,44, mediana = 1,72, p25= 1,69 e p75= 1,74 µg/mL. Valores $\geq 1,8$ indica amostras de DNA com boa pureza.

Os valores para a razão de 260/230 que reflete contaminação por compostos orgânicos e outras substâncias caotrópicas foram de valores máximo=2,02, mínimo = 0,12, mediana = 1,69, p25=1,27 e p75= 1,78 (Anexo 8).

6.2.3 Sequenciamento e análise no BLASTn

O sequenciamento refere-se à identificação dos nucleotídeos em um polímero de ácidos nucléicos, seja DNA ou RNA.

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger que consiste no sequenciamento por síntese (SBS) que se baseia em uma combinação de nucleotídeos terminadores de cadeia marcados com deoxi e didesoxi, evidenciando resultados que mostraram ausência de ruído no local do SNP eleito, rs2074192, G > A na fita antisense. O ruído ocorreu somente no início da reação e final da reação, sendo possível observar picos sobrepostos nestes locais (Figura 8-9-10).

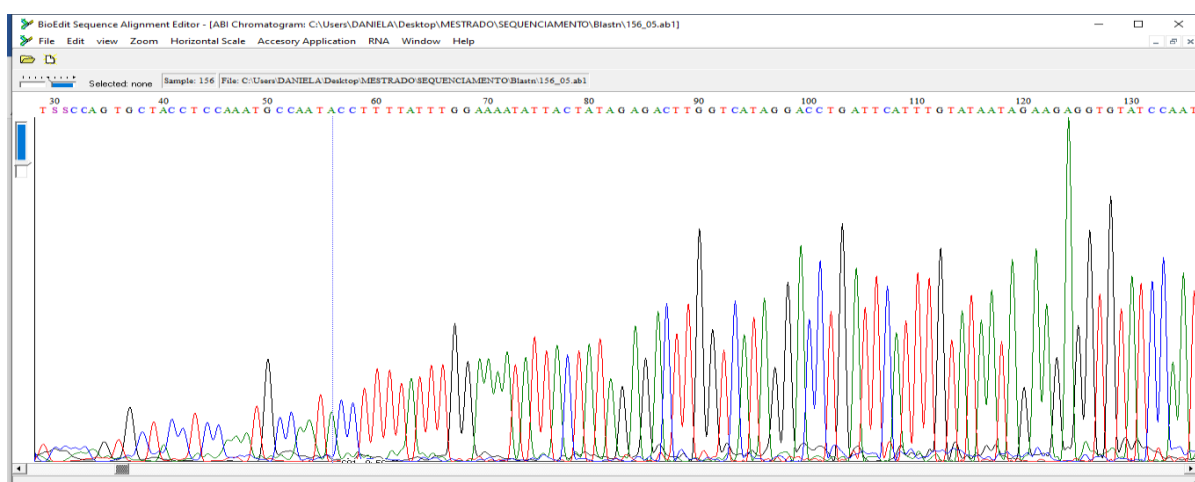


FIGURA 8- Análise do *amplicon* obtido para o gene *ACE2* utilizando os primers de Zhimin Fan et al (2019) com inclusão do rs2074192. Início do fragmento do sequenciamento de Sanger analisado pelo programa Bioedit. Nota-se picos pouco definidos no início do sequenciamento.

Fonte: Bioedit.

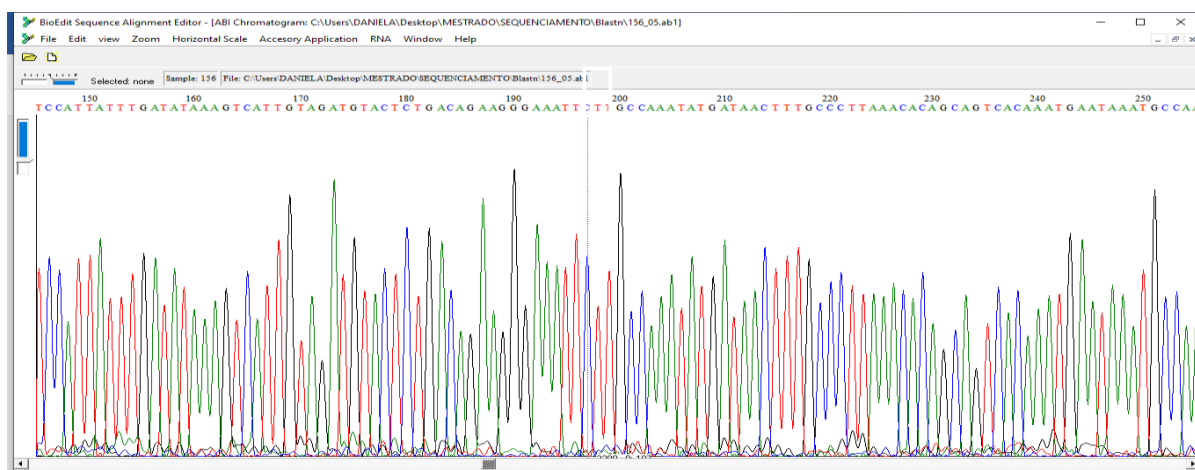


FIGURA 9- Análise do *amplicon* obtido para o gene *ACE2* utilizando os primers de Zhimin Fan et al (2019) com inclusão do rs2074192. Meio do *amplicon* do sequenciamento de Sanger analisado pelo programa Bioedit. Nota-se picos bem definidos no sequenciamento. Local do rs2074192, nucleotídeo G (guanina).

Fonte: Bioedit.

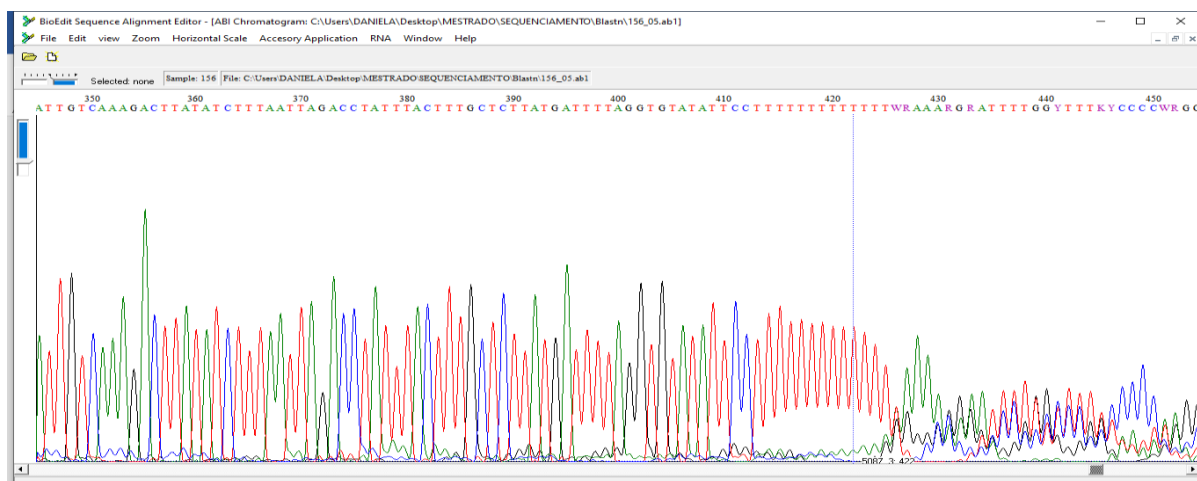


FIGURA 10- Análise do *amplicon* obtido para o gene *ACE2* utilizando os primers de Zhimin Fan et al (2019) com inclusão do rs2074192. Final do *amplicon* do sequenciamento de Sanger analisado pelo programa Bioedit. Nota-se picos bem definidos no sequenciamento. Sequência finda com vários nucleotídeos T (timina).
Fonte: Bioedit.

A análise dos dados ocorre entre a posição 53 até a posição 420 da sequência obtida e o SNP é identificado na fita *antisense* (Figura 11).

amostra 156- forma clínica indeterminada

```
ACCTTTTATTTGGAAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCAT
TTGTATAATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGT
CATTGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAAATTCTTGCCAAATATGATAACTTTG
CCCTTAAACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCATTTATACATTTCCA
CACTTACAACCTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCA
AGGCATGAAAGATGCATAATTGTCAAAGACTTATATCTTTAATTAGACCTATTT
ACTTTGCTCTTATGATTTTAGGTGTATATTCCTTTTTTTTTT
```

FIGURA 11 - Análise do sequenciamento do fragmento de 500 bp obtido e verificação do SNP rs 2074192 para fita antisense do fragmento que foi recortado no Bioedit. O fragmento de 367 bp do arquivo fasta obtido do sequenciamento. SNP variante G ou A.
Fonte: Bioedit - Modificado por Daniela Filadelfo Sanches.

A sequência de 367 bp obtida para amostra 156 foi analisada no BLASTn e alinhada com o gene *ACE2*, NG_012575. O alinhamento identificou similaridade de 99% contendo o rs2074192 (Figura 12-13-14).

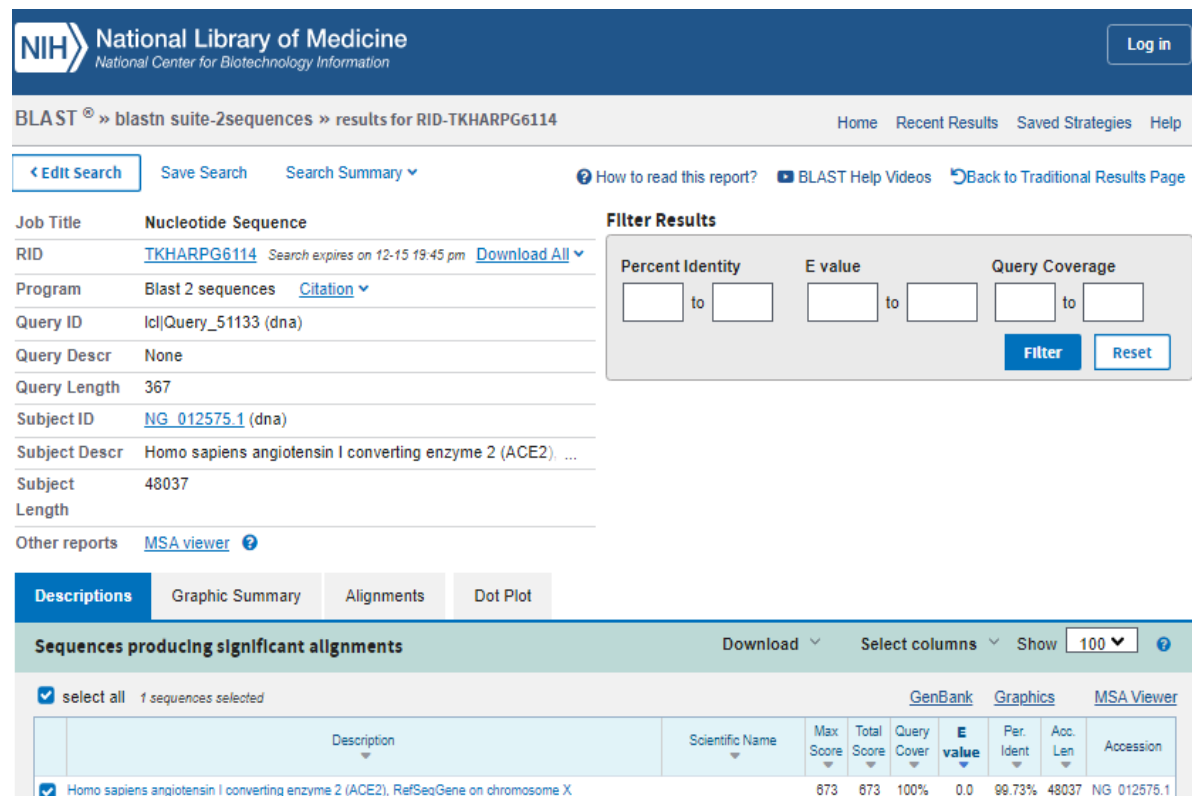


FIGURA 12- Descrição do alinhamento no Blastn (segunda página do BLASTn) para o amplicon de 367 bp, obtido por sequenciamento de Sanger. O alinhamento foi feito com o NG_012575 do gene ACE2, que continha o rs2074192.

Fonte: Programa Blastn.

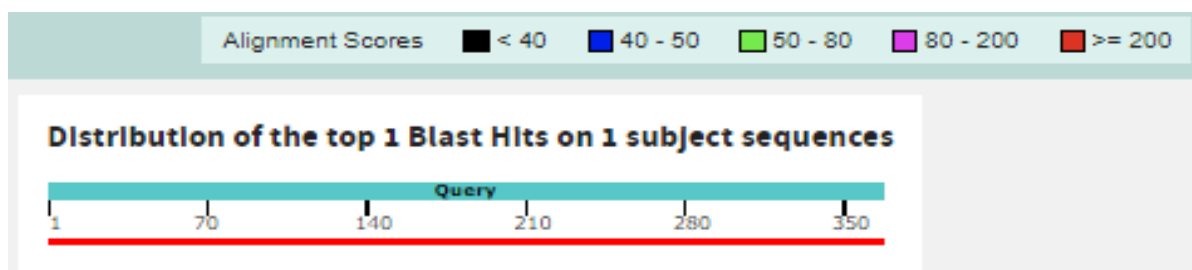


FIGURA 13- Resumo gráfico do alinhamento no Blastn (terceira página do BLASTn) para o amplicon de 367 bp, obtido por sequenciamento de Sanger. O alinhamento foi feito com o NG_012575 do gene ACE2, que continha o rs2074192.

Fonte: Programa Blastn.

Homo sapiens angiotensin I converting enzyme 2 (ACE2), RefSeqGene on chromosome X

Sequence ID: [NG_012575.1](#) Length: 48037 Number of Matches: 1

Range 1: 42208 to 42574 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
673 bits(364)	0.0	366/367(99%)	0/367(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACCTTTTATTTGGAAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCAATTTGTAT	68		
Sbjct 42288	ACCTTTTATTTGGAAAATACTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCAATTTGTAT	42267		
Query 61	AATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGTCATTGTAGATG	128		
Sbjct 42268	AATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGTCATTGTAGATG	42327		
Query 121	TACTCTGACAGAAGGGAAATCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGT	188		
Sbjct 42328	TACTCTGACAGAAGGGAAATCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGT	42387		
Query 181	CACAAATGAATAAATGCCARCCATTATACATTTCCACACTTACAACTCAATTTTCCAAT	248		
Sbjct 42388	CACAAATGAATAAATGCCARCCATTATACATTTCCACACTTACAACTCAATTTTCCAAT	42447		
Query 241	GGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCATGAAAGATGCATAATTGTCAAAGA	308		
Sbjct 42448	GGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCATGAAAGATGCATAATTGTCAAAGA	42507		
Query 301	CTTATATCTTTAATTAGACCTATTACTTTGCTCTTATGATTTAGGTGTATATTCCCTTT	368		
Sbjct 42508	CTTATATCTTTAATTAGACCTATTACTTTGCTCTTATGATTTAGGTGTATATTCCCTTT	42567		
Query 361	TTTTTTT 367			
Sbjct 42568	TTTTTTT 42574			

FIGURA 14- Alinhamento base a base e pontos de não alinhamento no Blastn (terceira página do BLASTn) para o *amplicon* de 367 bp, obtido por sequenciamento de Sanger. O alinhamento foi feito com o NG_012575 do gene ACE2, que continha o rs2074192.

Fonte: Programa Blastn – Modificado por Daniela Filadelfo Sanches.

A avaliação do SNP para o gene *ACE2*-rs **2074192** não mostrou diferenças nas frequências de guanina (G) e adenina (A) nos dois grupos avaliados, com a forma clínica cardíaca e indeterminada dos pacientes com DC. As avaliações para presença de hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes também não demonstraram diferenças nas frequências de SNP nos alelos G e A (Tabela 6 e 7).

TABELA 06- Relação de amostras não sequenciadas e sequenciadas com a presença dos alelos G ou A do polimorfismo do gene *ACE2* (*rs2074192*) de pacientes com doença de Chagas atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, portadores da forma clínica crônica indeterminada e cardíaca com presença ou ausência de hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes

	NÃO SEQ	ALELO G	ALELO A	Valor de p
FORMA INDETERMINADA 32 (67%)	2	20	10	0,96
FORMA CARDÍACA 16 (33%)	0	10	6	
HIPERTENSÃO (+) 27 (56%)		17	10	0,94
HIPERTENSÃO (-) 21 (44%)	2	13	6	
OBESO (+) 10 (21%)	1	6	3	0,76
OBESO (-) 37 (77%)	1	23	13	
IMC NÃO CALCULADO 1 (2%)		1		
DISLIPIDEMIA (+) 25 (52%)		16	9	0,90
DISLIPIDEMIA (-) 23 (48%)	2	14	7	
DIABETES (+) 13 (27%)		7	6	0,33
DIABETES (-) 35 (73%)	2	23	10	

A= adenina, G= guanina, SNP= *Single Nucleotide Polimorphism*. n total = 48 pacientes.

Não seq = Não sequenciado. (+) = Presença da variável. (-) = Ausência da variável. Nucleotídeo em vermelho foi sequenciado, rs= *reference sequence*. Fonte: De autoria própria.

TABELA 07- Identificação dos alelos G ou A para o gene *ACE2* (*rs2074192*) de pacientes com doença de Chagas atendidos no ambulatório de doenças tropicais do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, portadores das formas indeterminada e cardíaca, com presença ou ausência de hipertensão, obesidade, dislipidemia e diabetes.

	Forma indeterminada			Forma cardíaca		
	ALELO G	ALELO A	Valor de p	ALELO G	ALELO A	Valor de p
HIPERTENSÃO (+)	9 (55%)	6 (60%)	0,70	8 (80%)	4 (66,7%)	0,60
HIPERTENSÃO (-)	11 (45%)	4 (40%)		2 (20%)	2 (33,3%)	
OBESO (+)	3 (15,8%)	3 (30%)	0,63	3 (30%)	0 (0%)	0,25
OBESO (-)	16 (84,2%)	7 (70%)		7 (30%)	6 (100%)	
DISLIPIDEMIA (+)	11 (55%)	5 (50%)	0,79	5 (50%)	4 (66,7%)	0,63
DISLIPIDEMIA (-)	9 (45%)	5 (50%)		5 (50%)	2 (33,3%)	
DIABETES (+)	5 (25%)	4 (40%)	0,43	2 (20%)	2 (33,3%)	0,60
DIABETES (-)	15 (75%)	6 (60%)		8 (80%)	4 (66,7%)	

A= adenina, G= guanina; SNP= *Single Nucleotide Polimorphism*; n total = 48 pacientes; (+) = Presença da variável; (-) = Ausência da variável. Nucleotídeo em vermelho foi sequenciado; rs= *reference sequence*. Fonte: De autoria própria.

A análise de regressão logística para a chances de o paciente com DC apresentar a forma cardíaca da DC não foi significativa para nenhuma das variáveis analisadas, porém a HAS mostrou valor de "p" de 0,0697 (Tabela 8) com intervalo de confiança com valores que inclui o valor de 1.

TABELA 8- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca da DC, considerando presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), SNP para o gene ACE2 (G), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).

Variáveis	OR	IC95%		Pr > ChiSq ou valor de p
HAS	4,314	0,889	20,937	0,0697
ACE2 (G)	0,933	0,224	3,895	0,9247
Obesidade	0,494	0,086	2,844	0,4296
Dislipidemia	0,874	0,225	3,395	0,8457
Diabetes	1,096	0,22	5,456	0,9112
Idade	0,984	0,896	1,08	0,7294

HAS= hipertensão arterial sistêmica; ACE2= enzima conversora de angiotensina 2. G= guanina; obesidade considerada IMC > 30; idade em anos; OR = Grau de correlação linear entre variáveis; IC= Intervalo de confiança; Pr>ChiSq = Significância. Fonte: De autoria própria.

Após a retirada do SNP ACE2 (G) a regressão logística ainda não mostrou significância, porém após a análise o valor de "p" foi de 0,0697 para 0,054 para a variável HAS. A HAS parece contribuir nas chances do paciente chagásico apresentar a forma cardíaca da doença (Tabela 9), porém o intervalo de confiança que incluiu o valor de 1, não demonstrou significância.

TABELA 9- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca da DC, considerando a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).

Variáveis	OR	IC95%		Pr > ChiSq ou valor de p
HAS	4,702	0,974	22,7	0,054
Obesidade	0,464	0,083	2,579	0,3801
Dislipidemia	0,906	0,232	3,534	0,8874
Diabetes	1,214	0,266	5,537	0,8025
Idade	0,992	0,906	1,086	0,8597

HAS= hipertensão arterial sistêmica; obesidade considerada IMC > 30., idade em anos; OR = Grau de correlação linear entre variáveis; IC= Intervalo de confiança; Pr>ChiSq = Significância. Fonte: De autoria própria.

A retirada da variável HAS piorou a significância (Pr>ChiSq) para todas as variáveis e OR para ACE2 diminuiu seu valor após a retirada da HAS e todos os intervalos de confiança incluiu o valor de 1, demonstrando não ser significativo a influência das variáveis analisadas no desfecho da forma cardíaca da DC sem a HAS (Tabela 10).

TABELA 10- Regressão logística para a probabilidade de ocorrência da forma cardíaca considerando a presença de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único) para o gene ACE2(G), obesidade, dislipidemia, diabetes e idade (anos).

Variáveis	OR	IC95%		Pr > ChiSq ou valor de p
ACE2(G)	0,885	0,231	3,396	0,8588
Obesidade	0,903	0,182	4,464	0,8999
Dislipidemia	1,215	0,339	4,354	0,765
Diabetes	0,852	0,194	3,746	0,8318
Idade	1,006	0,922	1,098	0,8933

ACE2 = enzima conversora de angiotensina 2; G= guanina; obesidade = IMC > 30; OR = Grau de correlação linear entre variáveis; IC= Intervalo de confiança; Pr>ChiSq = Significância. Fonte: De autoria própria.

Os resultados da regressão logística não foram significativos devido ao número de pacientes analisados e número de variáveis analisadas. O cálculo amostral, considerando a hipertensão arterial sistêmica para o cálculo do número de indivíduos por grupo, foi de 47 indivíduos, para 5% de erro e poder do teste de 80%, considerando o percentual de 75% de HAS na forma cardíaca e 46,9% na forma indeterminada.

7. DISCUSSÃO

Os resultados de polimorfismos para região rs 2074192 não demonstraram diferenças na frequência das bases G e A nas formas clínicas avaliadas e nem para HAS, apesar deste ser o primeiro estudo em DC utilizando a região mencionada. No entanto, alguns estudos relataram que diferentes populações de indivíduos, apresentam relação entre as variantes genéticas da *ACE 2* e o risco de desenvolver HAS, dentre estes, um estudo realizado em uma população chinesa, avaliando o SNP rs 2074192, verificou alta predisposição associada a HAS, além de um outro estudo realizado com homens australianos que também demonstrou aumento na prevalência da hipertensão arterial sistêmica na presença de polimorfismos com o rs eleito em nosso estudo. Nossos achados diferem da literatura devido ao número de pacientes avaliados. Os estudos anteriormente citados abrangiam uma casuística de mais de 100 pacientes (69-70).

Os SNPs são marcadores moleculares para identificação de predisposição genética a doenças. Devido a essa característica, selecionamos o SNP rs 2074192 descrito nos estudos com hipertensão arterial sistêmica, além de ter sido testado funcionalmente por outros autores, apresenta uma frequência de ocorrência de polimorfismos nesta região de 1% na população mundial.

Em média, 30% dos pacientes chagásicos com a forma cardíaca desenvolvem hipertensão, possivelmente pela presença de alguns fatores, como a carga genética, por exemplo, que contribuem para essa predisposição. Em nosso estudo foi possível observar que o fator idade e a forma clínica da DC, possuem potencial para o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica. A avaliação da probabilidade de o indivíduo desenvolver a forma cardíaca da DC, não mostrou que a HAS é um fator de risco, porém o valor de significância foi de 0,054. O percentil de pacientes com a forma cardíaca, foi de 75% e com a forma indeterminada, foi de 25%, reforçando ainda mais que a hipertensão é frequente na forma cardíaca. A hipertensão arterial sistêmica é a comorbidade mais frequentemente encontrada em pacientes chagásicos e a sua frequência aumenta com o envelhecimento do portador da DC. A HAS na população geral, aumenta após os 60 anos e possivelmente ocorre o mesmo na população de idosos e portadores da DC (71).

A HAS em indivíduos adultos, segundo o Ministério da Saúde e levantamento Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), apresentou um aumento no diagnóstico de 3,7% em 15 anos no Brasil. Os índices saíram de 22,6% em 2006 para 26,3% em 2021. A HAS, bem como outras doenças crônicas não

transmissíveis, são condições clínicas de caráter poligênico. Muitos genes associados com a hipertensão, estão distribuídos em diferentes genes não associados diretamente ao controle da pressão arterial. Estratégias para verificar associação de genes que possam servir como marcadores, abordam estratégias do genoma total e/ou através de genes alvos escolhidos, associados diretamente ou não ao sistema renina angiotensina. Nosso estudo abordou um gene do sistema renina angiotensina semelhante a outros estudos que mencionam a ACE 2 como um potencial alvo das alterações originadas pela HAS e disfunções cardíacas, além do seu papel em algumas doenças virais, como a COVID-19.

Os pacientes desse estudo, apresentaram idade média de 60 anos, equivalente a classificação de indivíduos idosos. Assim a probabilidade de HAS, diabetes, hipercolesterolemia e obesidade é aumentada devido ao envelhecimento fisiológico. O número de pessoas em risco de desenvolver doenças cardiovasculares é maior na população idosa, crescendo com o progredir da idade, sendo a HAS a primeira causa de mortalidade, além de ser importante causa de incapacidade.

É importante ressaltar que infecções crônicas, propiciam o envelhecimento precoce nos portadores (72). Este fenômeno é observado em pacientes portadores de HIV com a doença ativa. A associação da DC com outras comorbidades no processo de envelhecimento, merece atenção, pois o controle e o acompanhamento da DC em conjunto com o progresso das comorbidades crônicas podem melhorar o tratamento da DC, evitando assim possíveis danos irreversíveis ao sistema cardiovascular e propiciar melhora na qualidade de vida (39).

Os pacientes são acompanhados frequentemente no ambulatório sendo tratados para hipertensão, hiperglicemia e hipercolesterolemia. Diferenças estatísticas de pressão sanguínea, colesterol e frações e glicemia não foram observadas, concluindo o sucesso da assistência oferecida para esses indivíduos.

Os índices de obesidade e sobrepeso entre os idosos brasileiros cresceram no período de 2006 a 2019, de acordo com estudo conduzido em 2021. Conforme o estudo, a prevalência de sobrepeso aumentou de 53% para 61,4%, e a prevalência de obesidade, de 16,1% para 23% no público idoso (72).

A obesidade isoladamente não é um fator de risco para o aumento da mortalidade entre idosos. O ganho de peso parece associar ou interferir com a capacidade de deambulação; desequilíbrio postural, desequilíbrio ao caminhar, quedas e fraturas. Todos estes fatores podem resultar em quedas e fraturas, que em idosos correlacionam positivamente com diminuição da qualidade e expectativa de vida (73).

A frequência de obesidade nos indivíduos com uma a três comorbidades, foi de 18, 7% (n=9). O IMC considerado para classificação seguiu as normas do Ministério da Saúde, na qual a classificação de sobrepesos na população idosa considerou IMC >27 e obesos IMC >30. A porcentagem de sobrepeso nos dois grupos com uma a três comorbidades foi de 31,2% (n=15). Portanto, entre chagásicos indeterminados e cardíacos, há poucos sobrepesos e obesos.

A população de idosos cresce cada vez mais, devido à maior expectativa de vida. Segundo o IBGE, as pessoas com mais de 65 anos de idade devem passar de 14,9 milhões, em 2013, para 58,4 milhões, em 2060. Cerca de 25 a 30% das pessoas com mais de 65 anos têm diabetes e quase 50% dos adultos mais velhos têm pré-diabetes. A prevalência de diabetes tem sofrido um aumento em seus índices em idosos e a consequentemente haverá necessidade de maior assistência endocrinológica nessa população.

O paciente idoso está sujeito exatamente às mesmas complicações do diabetes que o paciente mais jovem, porém com maior risco de complicações cardíacas e vasculares, já que a idade é um agravante. Além disso, o idoso diabético quando comparado ao não diabético está mais sujeito a receber diversos medicamentos; apresentar perdas funcionais; dificuldade de locomoção; problemas cognitivos; depressão; quedas; fraturas; incontinência urinária e dores crônicas. Assim, devido ao risco cardiovascular aumentado, o paciente idoso com diabetes deve manter ótimos os níveis de pressão arterial e de colesterol (74).

Dos 48 participantes do nosso estudo, 27% são diabéticos e desse total, apenas 14,5 % também são hipertensos, ainda assim, mesmo que ocorrendo concomitantemente à DC, não demonstrou ser um fator de risco para o desenvolvimento de agravamento das formas clínicas da DC.

Ao aproximar da terceira idade, o corpo humano apresenta modificações, como: elevação de tecido adiposo no abdômen, elevação de percentual de gordura sanguínea, diminuição da massa muscular, perda de água e envelhecimento do sistema vascular. Estas alterações fazem com que aumente a chance de arteriosclerose. As dislipidemias nos idosos são frequentemente secundárias a diversos fatores como a obesidade e a diabetes, por exemplo (73).

A comparação de frequência dos alelos G e A para o rs 2074192 não apresentaram diferenças estatísticas. Apesar disso, estudos demonstram que o SNPs da ACE 2 é associado com a hipertensão essencial. Neste sentido, um estudo realizado com 402 indivíduos hipertensos e 203 normotensos de ambos o sexo, do sul de Xianjiang na China, relata que os genótipos de risco para hipertensão essencial foram: rs2074192 (TT+CT, OR= 1,72, 95% CI: 1,17–2,53), rs2106809 (TT,), rs4240157 (CC+C,), rs4646155 (TT+C,), rs4646188 (TT+CT), rs4830542 (CC+ CT) e rs879922 (CC+CG) (75).

O rs 2074192 foi associado com aumento de risco para hipertensão essencial somente em homens. Os pacientes hipertensos portadores do genótipo de controle (CC) para o rs2074192 (CC, OR =2,37, IC 95%: 1,28–4,39) foram associados com risco para hipertensão complicada por estenose de arteriosclerose carotídea $\geq 50\%$. O SNP para rs 4646155 ou rs4830542 (CC+CT) foram associados à fibrilação atrial, maior diâmetro do átrio esquerdo e níveis mais altos das proteínas do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A variante ACE2 rs2074192 foi associada com hipertensão essencial e hipertensão essencial com estenose de arteriosclerose carotídea $\geq 50\%$, enquanto outras 3 variantes de ACE2, rs4240157, rs4646155 e rs4830542, foram associadas a hipertensão essencial e fibrilação atrial relacionada ao remodelamento do átrio esquerdo (75).

A região do rs 2074192 também é associada à presença de diabetes mellitus tipo 2 e aumento de pressão arterial diastólica como foi observado em uma população de uygures (povo asiático que habitam região de Xinjiang no noroeste da China). A diabetes é uma comorbidade observada com frequência na hipertensão arterial sistêmica e o polimorfismo da ACE 2 tem demonstrado associação positiva com o genótipo em estudos realizados em uygures (76). Resultados semelhantes foram encontrados em homens caucasianos. O alelo C foi mais prevalente nos homens hipertensos para o rs 2074192. Em mulheres com hipertensão, foi verificado maior frequência do alelo G para o rs 4240157 e um aumento de massa do ventrículo esquerdo foi verificado para o alelo A do rs1978124 do gene ECA2 (77).

Outro estudo realizado em 402 indivíduos com hipertensão essencial e 233 normotensos associaram os seguintes rs com aumento de colesterol total (≥ 5.2 mmol/L): rs2074192 (TT + CT, P = 0.012), rs4240157 (CC + CT, P = 0.027), rs4646156 (AA+AT, P = 0.007), rs4646188 (TT + CT, P= 0.005), rs4830542 (CC + CT, P = 0.047), rs879922 (CC + CG, P = 0.001). Pan et al 2018, observaram que o polimorfismo da ACE2 com diferentes rs, correlacionou com um ou mais tipos de dislipidemia. Aumento de LDL-C foi associado ao SNP do rs 1978124 e rs 233575, baixo HDL- c foi associado com rs2285666, rs4646142 e rs4646155 e alto colesterol total com rs 2074192, rs4240157, rs4646156 e rs4830542. O SNP da ACE2 para o rs879922 (LDL-C e Colesterol total), rs2106809 (LDL-C, HDL-C e triglicerídeos) e rs4646188 (LDL-C, HDL-C, colesterol total e triglicerídeos) foram correlacionados com mais de dois tipos de dislipidemia. Sugere-se que o rs4646156 possui ótimo potencial como marcador de hipertensão, dislipidemia e associação com eventos cardiovasculares como o derrame isquêmico. Estes achados consolidam ainda mais a associação dos SNPs para ACE2, hipertensão e comorbidades que ocorrem concomitantemente (78).

Associação dos níveis de ACE2 em plasma tem demonstrado potencial como marcador de diagnóstico e prognóstico em pacientes com DC. A atividade da ACE2 e peptídeo natriurético tipo B (BNP) combinados, tem valor preditivo positivo para falha cardíaca em pacientes com DC. Associação positiva da atividade da Ace2 e gravidade clínica da DC e alterações do ecocardiograma foram correlacionadas positivamente. Assim, a ACE2 e seu papel na DC parece ser relevante, porém não existem estudos sobre SNP da ECA2 em pacientes com DC.

A escolha pelo método de sequenciamento de Sanger para nosso estudo, possibilitou uma maior especificidade na identificação da sequência do rs 2074192, além do custo equivalente é possível ser realizado em aparelhos de sequenciamento convencional ou outros.

O produto do sequenciamento de Sanger é tipicamente um cromatograma. O cromatograma contém dados valiosos que comprovam a precisão da sequência gerada. Cada cor corresponde a um nucleotídeo e os picos ao nucleotídeo lido. O software de chamada de base faz o possível para interpretar o cromatograma, mas nem sempre é preciso, especialmente com dados de baixa qualidade. Em nosso experimento, os cromatogramas obtidos apresentaram picos bem definidos e separados no local do rs2074192; portanto, é possível inspecionar visualmente os picos gerados em cada cromatograma com precisão, resultando no sucesso do sequenciamentos

As primeiras 20 a 40 bases normalmente não são bem definidas e os nossos cromatogramas também seguiram este padrão. Os fragmentos foram de bom tamanho pois não apresentaram erros de migração durante a eletroforese capilar como mencionado para os produtos de sequenciamento muito curtos, os quais não migram de forma previsível durante a eletroforese capilar, e o software de análise tem dificuldade em atribuir bases dentro desta região, fazendo com que regiões não sequenciadas (Ns) apareçam na sequência.

Para evitar que o local de interesse fique nas regiões Ns, locais em que não é possível atribuir nucleotídeos, foram testados *primers* de estudos anteriores e o fragmento obtido foi de aproximadamente 500 bp, longe das bases principais, como a maioria dos estudos. A sequência do primer não é observada nos resultados, pois as bases dentro do *primer* não são marcadas durante a reação de extensão.

No meio do fragmento os picos devem ser nítidos e bem espaçados para que as bases possam ser identificadas com precisão e sem dúvidas. Nos casos em que há dúvida sobre a identificação da sequência, é observada a fita anti-sense e sequenciada novamente para confirmação. Ao final também observou-se picos menos definidos, sendo estes descartados na análise.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) determina que a frequência alélica permanece constante por muitas gerações nas situações em que: a população é grande, homogênea, com acasalamentos ao acaso e onde duas cópias do mesmo gene são herdadas independentemente. Esse parâmetro tem se consolidado, uma vez que, desvios no equilíbrio podem indicar erros na determinação do perfil dos marcadores, endogamia, estratificação populacional ou seleção. Em nossa análise, verificamos que as frequências dos polimorfismos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ao comparar estatisticamente os dados obtidos, a regressão logística, permitiu verificar que o polimorfismo para o rs 2074192 com o nucleotídeo "G" diminui a probabilidade de o indivíduo desenvolver a forma cardíaca. Assim, predizer que a possibilidade do portador de DC manter a forma indeterminada também pode ter um grande benefício para o acompanhamento destes indivíduos, já que o nucleotídeo "G" pode ser associado à manutenção da forma indeterminada. Estes achados ainda são fracos para tal afirmativa, pois foi realizado somente em duas formas clínicas, sem a presença da forma mista e digestiva, além do número reduzido de pacientes de uma unidade de saúde.

A presença do polimorfismo não demonstrou relação com a gravidade da DC e com as comorbidades relacionadas nos pacientes do presente estudo que são acompanhados no ambulatório. No entanto, em uma amostragem maior e em indivíduos doentes que não realizam quaisquer tipos de acompanhamento e/ou tratamento, não podemos afirmar a ausência dessa relação.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O polimorfismo do gene *ACE* 2 rs 2074192 não mostrou diferenças de frequências do SNP avaliado, nas duas formas clínicas da DC;
- A avaliação da frequência do rs 2074192 para a presença de hipertensão, obesidade, diabetes e dislipidemia, também não mostraram diferenças estatísticas na frequência do SNP;
- As variáveis idade, IMC, frequência de hipertensão, hiperglicemia e hipercolesterolemia não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos com a formas indeterminada e cardíaca;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Da J, Brito S, Sanches CT, Killesse M, Luiz De Faria J, Dias Costa GA, et al. Doença De Chagas: Aspectos Fisiopatológicos E Históricos. Vol. 1, Atenas Higeia. 2019.
2. Lima R de S, Teixeira AB, Lima VL da S. Doença de chagas: uma atualização bibliográfica. Revista Brasileira de Análises Clínicas. 2019;51(2).
3. Adriene Muniz B, Silva dos F, Bruno Nascimento V, Rodrigues R, de S. Perfil De Transmissão Da Doença De Chagas No Brasil: 2008 A 2020 Resumo Abstract. Vol. 7, Revista Presença-Rio de Janeiro.
4. WHO Technical Report Series 905. Control of Chagas Disease. Geneva 2002.
5. Mota Mendonça R, Medeiros da Rocha A, Andrade MS, dos Santos Silva AB. Doença de Chagas: serviço de referência e epidemiologia. Revista Brasileira em Promoção da Saúde. 2020;33:1–12.
6. Alves Da Nóbrega A. Carga de doença associada à cardiomiopatia chagásica no Brasil. 2014.
7. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico [Internet]. Disponível em: www.saude.gov.br/svs
8. Guia de Vigilância Epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2009.
9. Oswaldo Cruz F, Novaes Ramos Jr A, Aldo da Silva Valente S. Guia Para Vigilância, Prevenção, Controle E Manejo Clínico Da Doença De Chagas Aguda Transmitida Por Alimentos Greice Madeleine Ikeda do Carmo Ministério da Saúde do Brasil [Internet]. 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277816526>
10. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia e Serviços de Saúde [Internet]. junho de 2016;25(21):1–10. Disponível em: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000500007&scielo=S2237-96222016000500007
11. Higgs HN, Peterson KJ. Essay Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain □ D. Mol Biol Cell [Internet]. 2005;16:1–13. Disponível em: www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E04
12. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL. Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. Vol. 62, Journal of the American College of Cardiology. 2013. p. 767–76.
13. Rassi A, Marin-Neto A. Seminar Chagas disease [Internet]. Vol. 375, Lancet. 2010. Disponível em: www.thelancet.com

14. Navarro E, Corrente JE, Pereira PC, Navarro EC, Miziara De Abreu M, Tavares FC, et al. Indeterminate Form of Chagas' Disease and Metabolic Syndrome: A Dangerous Combination Article Evaluation of sample preparation procedures for aflatoxin analysis in raw peanut View project Indeterminate Form of Chagas' Disease and Metabolic Syndrome: A Dangerous Combination. American Journal of Medicine and Medical Sciences [Internet]. 2013;2013(3):68–73. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/259577778>
15. Rodrigues Coura J. Sítios na Internet: Tripanosomose, Doença De Chagas. Vol. 72, Acta Tropica. 1999.
16. Ayo CM, Dalalio MMDO, Visentainer JEL, Reis PG, Sippert EÂ, Jarduli LR, et al. Genetic Susceptibility to Chagas disease: An overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. Vol. 2013, BioMed Research International. 2013.
17. Biolo A, Ribeiro AL, Clausell N. Chagas Cardiomyopathy-Where Do We Stand After a Hundred Years? Vol. 52, Progress in Cardiovascular Diseases. 2010. p. 300–16.
18. B. Bestetti R. Cardiomiopatia Chagásica Crônica: Diagnóstico E Tratamento. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo. 2016;246–51.
19. Básica A, Noemia A, Carvalho B, Maya M, Ruth A, Leite M, et al. Manual de Atendimento a Pacientes com Doença de Chagas. 2014.
20. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. Vol. 49, Journal of Physical Oceanography. American Meteorological Society; 2019.
21. Santos É, Menezes Falcão L. Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. Vol. 39, Revista Portuguesa de Cardiologia. Sociedade Portuguesa de Cardiologia; 2020. p. 279–89.
22. Guariento ME, De M, Ramos C, Antônio J, Gontijo R, Santos S Dos, et al. Doença de Chagas e Hipertensão Arterial Primária.
23. Zhou B, Perel P, Mensah GA, Ezzati M. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. Vol. 18, Nature Reviews Cardiology. Nature Research; 2021. p. 785–802.
24. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. Vol. 16, Nature Reviews Nephrology. Nature Research; 2020. p. 223–37.
25. Alare K, Odedele T, Akindele Z. Neglected Tropical Disease as an Hidden Cause of Cardiovascular Diseases: A Systematic Review of Cardiovascular Manifestations of Schistosomiasis, African Trypanosomiasis and Chagas Disease. J Clin Exp Cardiol [Internet]. 2022;13:1000721. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/360743192>
26. Bestetti RB, Dellalibera-Joviliano R, Lopes GS, Faria-Jr M, Furlan-Daniel R, Lopes KC, et al. Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg cytokine profile in patients with

- chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension. *Heart Vessels*. 22 de janeiro de 2019;34(1):123–33.
27. Rangel-Gamboa L, López-García L, Moreno-Sánchez F, Hoyo-Ulloa I, Vega-Mémije ME, Mendoza-Bazán N, et al. Trypanosoma cruzi infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. *Parasit Vectors*. 30 de outubro de 2019;12(1).
 28. Schramm Neto FAR, Faria CD de, Machado Y de J, Oliveira L de O e, Medeiros RC de, Carneiro MMN, et al. A relação entre a doença de Chagas e a hipertensão arterial sistêmica: revisão integrativa. *Research, Society and Development*. 10 de novembro de 2022;11(15):e81111537133.
 29. Schramm Neto FAR, Faria CD de, Machado Y de J, Oliveira L de O e, Medeiros RC de, Carneiro MMN, et al. A relação entre a doença de Chagas e a hipertensão arterial sistêmica: revisão integrativa. *Research, Society and Development*. 10 de novembro de 2022;11(15):e81111537133.
 30. De Medeiros CA, De Silva MBA, De Oliveira ALS, Alves SMM, Das Da Silveira Barros MND, De Melo Cavalcanti MDGA, et al. Mapping the morbidity and mortality of Chagas disease in an endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2022;64.
 31. Mesquita ET, de Souza ALA de AG, Rassi S. Heart failure awareness day: A tribute to the genius Carlos Chagas. Vol. 113, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2019. p. 5–8.
 32. Vizzoni AG, Varela MC, Sangenis LHC, Hasslocher-Moreno AM, Do Brasil PEAA, Saraiva RM. Ageing with Chagas disease: An overview of an urban Brazilian cohort in Rio de Janeiro. *Parasit Vectors*. 19 de junho de 2018;11(1).
 33. Simões MV, Romano MMD, Schmidt A, Martins KSM, Marin-Neto JA. Chagas Disease Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiovascular Sciences*. 2018;
 34. Martinez F, Perna E, Perrone S V., Liprandi AS. Chagas disease and heart failure: An expanding issue worldwide. *European Cardiology Review* . 2019;14(2):82–8.
 35. Leirião P, Rodrigues CD, Albuquerque SS, Mota MM. Survival of protozoan intracellular parasites in host cells. Vol. 5, *EMBO Reports*. 2004. p. 1142–7.
 36. Araújo-Jorge TC. Resposta do hospedeiro à infecção Respostas Imune Inata, Inflamatória e de Fase Aguda na Doença de Chagas.
 37. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. Vol. 34, *Seminars in Immunopathology*. 2012. p. 753–70.
 38. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular 8ª EDIÇÃO*.
 39. Pereira N de S, Queiroga TBD, Nunes DF, Andrade C de M, Nascimento MSL, Do-Valle-Matta MA, et al. Innate immune receptors over expression correlate with chronic

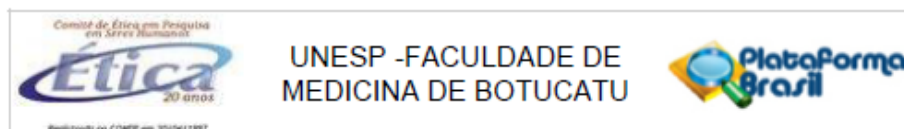
- chagasic cardiomyopathy and digestive damage in patients. PLoS Negl Trop Dis. 25 de julho de 2018;12(7).
40. Roberto De Oliveira Junior L. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Faculdade De Medicina Vitamina D E L1-37 Em Pacientes Com Doença De Chagas.
 41. Vicco MH, Rodeles L, Yódice A, Marcipar I. Chagas disease, a risk factor for high blood pressure. Blood Press. 1º de dezembro de 2014;23(6):345–8.
 42. Williams-Blangero S, Vandeberg JL, Blangero J, Corrêa-Oliveira R. Genetic Epidemiology Of Trypanosoma Cruzi Infection And Chagas’ Disease. Vol. 8, Frontiers in Bioscience. 2003.
 43. Mendes da Silva LD, Gatto M, Miziara de Abreu Teodoro M, de Assis Golim M, Pelisson Nunes da Costa A, Capel Tavares Carvalho F, et al. Participation of TLR2 and TLR4 in Cytokines Production by Patients with Symptomatic and Asymptomatic Chronic Chagas Disease. Scand J Immunol. 1º de janeiro de 2017;85(1):58–65.
 44. Gomes Rola M, Brandão Ferreira L. Polimorfismos genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica.
 45. A haplotype map of the human genome The International HapMap Consortium * [Internet]. Disponível em: www.nature.com/nature.
 46. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation [Internet]. Disponível em: www.genome.org
 47. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature. 18 de outubro de 2007;449(7164):851–61.
 48. Lopes J, Fietto R, Ferreira Maciel TE. Sequenciando genomas.
 49. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms The International SNP Map Working Group* [Internet]. 2001. Disponível em: <http://ncbi.nlm>.
 50. Campos de Oliveira L, Ramasawmy R, Dias Borges J, Carnevale Marin ML, Guida Muller N, Kalil J, et al. Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil. Einstein. 2011;359.
 51. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. Science (1979). 15 de maio de 1998;280(5366):1077–82.
 52. Li WH, Sadler LA. Low Nucleotide Diversity in Man. 1991.
 53. Martinez PF, Okoshi MP. Genetic risk in coronary artery disease. Vol. 111, Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Arquivos Brasileiros de Cardiologia; 2018. p. 62–3.

54. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease [Internet]. Vol. 40, Cardiovascular Research. 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/40/2/375/355139>
55. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 27 de outubro de 2000;275(43):33238–43.
56. Francischetti EA. The Emergence of a New Cardiovascular Modulator 2nd Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Epigenetics and metabolism View project [Internet]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237794733>
57. Crackower MA, Sarao R, Oliveira-dos-Santos AJ, Da Costa J, Zhang L. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 20 de junho de 2002;417(6891):822–8.
58. Karen Ferreira da Silva J, Elvira Alvares L. O gene ACE2 e suas múltiplas funções na Covid-19. Vol. 16, *Genética na Escola*.
59. Gembardt F, Sterner-Kock A, Imboden H, Spalteholz M, Reibitz F, Schultheiss HP, et al. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides (NY)*. julho de 2005;26(7):1270–7.
60. Da M, Obesidade S. *Cadernos De Atenção Básica*. 2006.
61. Tavares EL, Santos DM dos, Ferreira AA, Menezes MFG de. Avaliação nutricional de idosos: desafios da atualidade. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia*. setembro de 2015;18(3):643–50.
62. Mco I, Jfk S, Apm C, Neto AA, Neto FJ, Filho MJ, et al. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose-2017 Autores da Diretriz.
63. Consenso Brasileiro Sobre Diabetes Diagnóstico E Classificação Do Diabetes Mellitus E Tratamento Do Diabetes Mellitus Tipo 2 Versão Final e Definitiva.
64. Bundy JD, Mills KT, He J. Comparison of the 2017 ACC/AHA Hypertension Guideline with Earlier Guidelines on Estimated Reductions in Cardiovascular Disease. Vol. 21, *Current Hypertension Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2019.
65. Fan Z, Wu G, Yue M, Ye J, Chen Y, Xu B, et al. Hypertension and hypertensive left ventricular hypertrophy are associated with ACE2 genetic polymorphism. *Life Sci*. 15 de maio de 2019;225:39–45.
66. Daniel B, Vieira P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações [Internet]. Disponível em: www.etall.hpg.com.br

67. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Boletim Epidemiológico Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica.
68. Bosso M, Thanaraj TA, Abu-Farha M, Alanbaei M, Abubaker J, Al-Mulla F. The Two Faces of ACE2: The Role of ACE2 Receptor and Its Polymorphisms in Hypertension and COVID-19. Vol. 18, *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. Cell Press; 2020. p. 321–7.
69. Patel SK, Wai B, Ord M, MacIsaac RJ, Grant S, Velkoska E, et al. Association of ACE2 genetic variants with blood pressure, left ventricular mass, and cardiac function in caucasians with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. fevereiro de 2012;25(2):216–22.
70. Elena Guariento M, Canola Alliegro F, Antonio de Almeida E. Doença de Chagas associada a doenças crônicas em pacientes assistidos em ambulatório de hospital universitário. *Rev Bras Clin Med*. 209DC;84–8.
71. da Silva LES, de Oliveira MM, Stopa SR, Gouvea E de CDP, Ferreira KRD, Santos R de O, et al. Temporal trend of overweight and obesity prevalence among Brazilian adults, according to sociodemographic characteristics, 2006-2019. *Epidemiologia e Servicos de Saude*. 2021;30(1).
72. Medha Munshi M. Treatment of type 2 diabetes mellitus in the olderpatient. julho de 2023.
73. Ritchie C, Yukawa M. Geriatric nutrition_ Nutritional issues in older adults – UpToDate. 2023.
74. Luo Y, Liu C, Guan T, Li Y, Lai Y, Li F, et al. Association of ACE2 genetic polymorphisms with hypertension-related target organ damages in south Xinjiang. *Hypertension Research*. 1º de maio de 2019;42(5):681–9.
75. Liu C, Li Y, Guan T, Lai Y, Shen Y, Zeyaweiding A, et al. ACE2 polymorphisms associated with cardiovascular risk in Uygurs with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 18 de setembro de 2018;17(1).
76. Patel SK, Wai B, Ord M, MacIsaac RJ, Grant S, Velkoska E, et al. Association of ACE2 genetic variants with blood pressure, left ventricular mass, and cardiac function in caucasians with type 2 diabetes. *Am J Hypertens*. fevereiro de 2012;25(2):216–22.
77. Pan Y, Wang T, Li Y, Guan T, Lai Y, Shen Y, et al. Association of ACE2 polymorphisms with susceptibility to essential hypertension and dyslipidemia in Xinjiang, China. *Lipids Health Dis*. 20 de outubro de 2018;17(1).

10. ANEXOS

Anexo 1- Aprovação no comitê de Ética em Pesquisa Clínica.



Continuação do Parecer: 5.159.061

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1766382.pdf	09/11/2021 17:01:04		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoanuenciagestoesdaarea.pdf	09/11/2021 16:58:57	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termoanuenciahcfmb.pdf	09/11/2021 16:58:26	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termoanuenciainstitucional.pdf	22/10/2021 10:07:27	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomestradodaniela.pdf	22/10/2021 10:03:12	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorep.jpg	01/10/2021 10:34:11	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	01/10/2021 10:32:06	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	09/09/2021 16:09:53	DANIELA FILADELFO SANCHES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 10 de Dezembro de 2021

Anexo 2- Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distribuição Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 38801608/3880-1609
e-mail secretaria: cap.fmb@unesp.br
e-mail coordenadora: gmoirao@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do meu Projeto de Pesquisa intitulado "Polimorfismos do gene Ace2 em pacientes com doença de Chagas", que será desenvolvido por mim Daniela Filadelfo Sanches, Biomédica, com orientação da Biomédica e Professora Dra. Cilmary Suemi Kurokawa da Faculdade de Medicina de Botucatu -UNESP.

Busco detectar polimorfismos em pacientes portadores em uma doença infecciosa (doença de Chagas). Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso utilizar amostras que já foram coletadas e que estão armazenadas no banco de dados da Faculdade de Medicina de Botucatu, realizando posteriormente os seguintes métodos: extração de DNA e técnica PCR-RFLP. Todos estes procedimentos, não trarão quaisquer riscos para os participantes deste estudo.

Esclareço que o material biológico que já foi colhido do Senhor (a), não será utilizado em sua totalidade e parte dele voltará a ser armazenado na Faculdade de Medicina, podendo ser empregado para pesquisas posteriores, em outros projetos e com outros pesquisadores. Declaro ainda, que não haverá custo aos participantes da presente pesquisa.

É garantido a todos os participantes do presente estudo, o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa

Solicito ainda seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas e realizar ligações pertinentes a presente pesquisa, a fim de adquirir dados como: resultados de exames laboratoriais, comorbidades e qual a forma da doença de Chagas no atual momento, sendo estes dados referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a).

Neste momento, o (a) senhor (a) não terá nenhum benefício. Contudo, sua contribuição é de grande valia, pois a intenção deste projeto de pesquisa é permitir que, no futuro, pacientes com a mesma doença possam ter um tratamento mais adequado.

Anexo 3- Verificação do RS no site db SNP

[Access keys](#) [NCBI Homepage](#) [MyNCBI Homepage](#) [Main Content](#) [Main Navigation](#)
[dbSNP](#)

1.[rs2074192](#) [*Homo sapiens*]

Variant type: SNV

Alleles: C>T [Show Flanks]

Chromosome: X:15564667 (GRCh38) - X:15582790 (GRCh37)

[Canonical SPDI](#): NC_000023.11:15564666:C:T

Gene: ACE2 ([Varview](#))

Functional Consequence: intron_variant

Validated: by frequency,by alfa,by cluster

MAF:

T=0.430587/24385 (ALFA)

C=0.147059/5 (Siberian)

C=0.176692/47 (SGDP_PRJ)

T=0.324074/35 (Qatari)

T=0.325/13 (GENOME_DK)

T=0.363179/1371 (1000Genomes)

T=0.37412/425 (Daghestan)

T=0.382979/108 (PharmGKB)

T=0.394125/104321 (TOPMED)

T=0.396341/130 (HapMap)

T=0.403908/41447 (GnomAD)

C=0.4375/21 (Vietnamese)

T=0.448727/5763 (TOMMO)

T=0.454577/1331 (KOREAN)

T=0.456311/1692 (TWINSUK)

T=0.465905/1346 (ALSPAC)

Anexo 4- >NG_012575.1 Homo sapiens angiotensin I converting enzyme 2 (ACE2), RefSeqGene on

CAGTTTGTCGAATTGGCTCAAAATGTTTCCCAACAACAGACAGCAGGAGCGAAAGATGGATTGACCTTGCA
GATGGTTTCTGTCTATTATAAAAAAGGCTTAATATACCTACTGCTTCTGGGCAGCTCACTAGGTGGCCCTC
TCGAGCTGCGTCAGAGTCTGTGTTAACTTCGGAAGCAGATCTAAGACCTGCTGGGCAGGGTGTGCCTAGA
AAATCTGGCTTGGTTGGAGTGATGACCAACTGTGCCAGAGACTCACTCACTTCTCCAGAAGACTTG
TGTCTGTCTTGGGAAAAACTTCTGGCTGAGATCTTTATGAAAAAGCTCAGCCTTCTGGATACTCAGCTG
CAAGCTACAGGGGACCTCAGACTCTCTGTTTCCAGGATGACTCTTTTCAGATCTTTTCTGGCTGAGGTG
CCAGGGGTACCTGACTAATTCTGCGTTGATCTCTCTCTCTCTCTCTGGTGGACTCTGACCTCTGACCT
GGGCTATACCAAGGGTAGGAAGATGAGATGCCAGACACTTTGGTCTTTGATCCAGAATGTTCTCCATAT
CATTGTTTTTTTTTTTCTTTAAACAATCTTTATCCTTTTGCTCCATAAAA **GTAAGGCCATTTCCTATCCG**
AGTGCTGAAGAACTGGCAAAGGTCCCTTTCTTATGTGCTCCCCAGTGCTACCTCCAAATGCCAATACC
TTTTATTGGAAAATACTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCATTGTATAATAGAAGAGGTG
TATCCAATTATCCGTTTCCATTATTGATATAAAGTCATTGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAAATTCT
TGCCAAATATGATAACTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCAATTATACATT
TCCACACTTACAACCTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCATGAAAGA
TGCATAATTGTCAAAGACTTATATCTTTAATTAGACCTAATTACTTTGCTCTTATGATTTTAGGTGTATA
TTCCTTTTTTTTTTTTTTGAACAGAGTCTTGCTCTGTACCTAGGC **TAGAGGGCAGTGGCACAAT** CTCG
GCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGTTCAAGCGATTCTCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTA
CAGACATGCGCCACCATGCCTGGCTAGGTGTATATTCTTATGATAAGCTCTATTATATCCTTTAGGAAC
AATGATATAAACAGTAAATAACTACACACAATTTTATTTTGCTAAAGTGTCCTTCTGCTGTTTTTGTCT
TTTGCAAATAGGATGTCCCGGAGCCGTATCAATGATGCTTTCCGTCTGAATGACAACAGCCTAGAGTTTC
TGGGGATACAGCCAACACTTGGACCTCCTAACCAGCCCCCTGTTTCCATATGGCTGATTGTTTTTGGAGT
TGTGATGGGAGTGATAGTGGTTGGCATTGTATCCTGATCTTCACTGGGATCAGAGATCGGAAGAAGTAA
GTGGCCTTTCTAGACTTAACTATCCAAAAATAGAAAGATTAGAGAACAGTAACTGGAAAATTTTCAGT
AAGTGGTAGATTGTATAGACCAATTAAGTTGGACAATTTTGAACATAAATACTCTGATGCATTCCTT
AGAAATTTAATAGATCAGCAGTTTATCTTCTAGTAAGCCACACAGTAAAGTATCTGGCCTGGGATTAT
TAGCATGCCCTAGTAACTCCATCCAGCCACAGTGTCATTTCCCTCTCAAAAAGGGCACTGCAAACTC
AGCAGGTATGGGTGGGCTCAGGGAATGGTTTTACTGCTCTCACTGCTGAATCCTTTTCAGTCTAAAAGT
GGGGACTGGATTGCTGGAGACTGGATTGCTGATGGGTTTGAACCGTGAAATTGTTCAAGAATGGGCTGTG
AGATTTCTTTGAAACTGCTACTCTTGGTTTTTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGAGACAGAGTCTT
GCTCTGTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGAACCATAGTTCAGTGAACCTCGATTCCCAGGCTCAA
GTGATCGTCCCACTCAGCTTCTGAGTAGCTGGGACTACAGGGGTGTGCCACCACACCCAGCTAATTTT
TGTATTTTTTGTGGAGACAGGGTTTTGTATGTTGCCCAAGCTTTTCTGAACTCCTGAGTTCAAGCAAT
CCGCCTGCCTCGCCCTCAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCGTGCCCTGCCCAAACCTGCTACTCT
TACTCAGCTTTATTTCTACCCGGGTAGCTCAGACTCTATGTCATTCTCTTAGTTCATGGTTAGGCACGT
TCTAATTTGTTCTGAACTGAAGATCAAAGTTCAATTGAGGATTTAAATTACCAGAGACCTGATTCTAGT
CTTGCTTTGCTACTAGATGTTTTTCTTCTGTCTTAAGAAATTGACTCTTGCTGGGCTTATGGAATGAAG
GTAAATATTTTATAGCACCTAAACAAAACCTATGCACACCTCAGCTTGTTTAAACATATTCTTGATTGAA
TCTCTATATTGCTAGTCTATTTTGTCTCAATTTTCTTCACTATAGAGATTTTTCGTTTCTCCAAAATAGC

Anexo 5

Email – Dani Sanches – Outlook

rs2074192 Relatório RefSNP - di

TaqMan Search

ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2074192#variant_details

Feedback

Posicionamentos genômicos

Nome da sequência	Mudar
ACE2 RefSeqGene	NG_012575.2:g.42492G>A
ACE2 RefSeqGene	NG_012575.1:g.42403G>A
GRCh37.p13 chr X	NC_000023.10:g.15582790C>T
GRCh38.p13 chr X	NC_000023.11:g.15564667C>T

Gene: ACE2 , enzima conversora de angiotensina 2 (cadeia menos)

Tipo de molécula	Mudar	Aminoácido[Códon]	Termo SO
Variante de transcrição de ACE2 1	NM_001371415.1:c.2115-449...	N / D	Variante de Intron
Variante de transcrição de ACE2 2	NM_021804.3:c.2115-449G>A	N / D	Variante de Intron
Variante de transcrição de ACE2 3	NM_001386259.1:c.2115-449...	N / D	Variante de Intron
Variante de transcrição de ACE2 4	NM_001386260.1:c.1782-449...	N / D	Variante de Intron
Variante de transcrição de ACE2 5	NM_001388452.1:c.1077-449...	N / D	Variante de Intron

Anexo 6

ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2074192#frequency_tab

Frequência

Detalhes da variante

Significado clínico

HGVS

Envios

História

Publicações

Flancos

Frequência

de alelos ALFA O projeto ALFA fornece frequência alélica agregada de dbGaP. Mais informações estão disponíveis [na página](#) incluindo descrições, acesso a dados e termos de uso.

Versão de lançamento: 20201027095038

Procurar:

População	Grupo	Tamanho da amostra	Alelo de referência	Alelo Alt
Total		Global	56632	C=0,56941 T=0,43059
Europeu		Sub	41772	C=0,55339 T=0,44661
Africano		Sub	5109	C=0,6837 T=0,3163
Outros africanos		Sub	190	C=0,658 T=0,342
afro-americano		Sub	4919	C=0,6847 T=0,3153
asiático		Sub	456	C=0,579 T=0,421
leste Asiático		Sub	388	C=0,575 T=0,425

Sanj Sanchez - Outlook

rs2074192 Relatório RefSNP - db

TabMan Search

População	Grupo	Tamanho da amostra	Alelo de referência	Alelo Alt
Africano		Sub	5109	C=0,6837 T=0,3163
Outros africanos		Sub	190	C=0,658 T=0,342
afro-americano		Sub	4919	C=0,6847 T=0,3153
asiático		Sub	456	C=0,579 T=0,421
leste Asiático		Sub	388	C=0,575 T=0,425
Outros asiáticos		Sub	68	C=0,60 T=0,40
América Latina 1		Sub	594	C=0,549 T=0,451
América Latina 2		Sub	4970	C=0,5801 T=0,4199
Sul da Ásia		Sub	180	C=0,761 T=0,239
Outro		Sub	3551	C=0,5711 T=0,4289

Procurar: [Download](#)

Estudar

População

Grupo

Tamanho da amostra

Alelo de referência

Alelo Alt

Anexo 7

Email – Dani Sanchez – Outlookrs2074192 Relatório RefSNP - diTaqMan Search

ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2074192#hgvs_tab

Procurar:

Frequência

Detalhes da variante

Significado clínico

HGVS

Envios

História

Publicações

Flancos

Canal	C=	T
ACE2 RefSeqGene	NG_012575.2:g.42492=	NG_012575.2:g.42492G>A
ACE2 RefSeqGene	NG_012575.1:g.42403=	NG_012575.1:g.42403G>A
Transcrição ACE2	NM_021804.2:c.2115-449=	NM_021804.2:c.2115-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 1	NM_001371415.1:c.2115-449=	NM_001371415.1:c.2115-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 2	NM_021804.3:c.2115-449=	NM_021804.3:c.2115-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 3	NM_001386259.1:c.2115-449=	NM_001386259.1:c.2115-449G>A
Variante de transcrição ACE2 4	NM_001386260.1:c.1782-449=	NM_001386260.1:c.1782-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 5	NM_001388452.1:c.1077-449=	NM_001388452.1:c.1077-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 6	NM_001389402.1:c.1782-449=	NM_001389402.1:c.1782-449G>A
Variante de transcrição de ACE2 X1	XM_005274571.1:c.2115-449=	XM_005274571.1:c.2115-449G>A
GRCh37.p13 chr X	NC_000023.10:g.15582790=	NC_000023.10:g.15582790C>T

Regiões genômicas, transcrições e produtos

Feedback

POR PTB2 20:39 04/10/2022

Anexo 8- Quantificação dos produtos de pcr para sequenciamento.

Forma clínica	Amostra	Concentração (µg/mL)	A260/A280	A260/A230
Indeterminada	05	36,0		
Indeterminada	06	25,0		
Cardíaca	08	25,0		
Indeterminada	11	16,6		
Cardíaca	14	27,0		
Cardíaca	17	66,0		
Indeterminada	24	65,0		
Indeterminada	46	40,0		
Cardíaca	51	52,5		
Cardíaca	52	54,5		
Indeterminada	65	70,0		
Indeterminada	68	60,0		
Cardíaca	20	17,5	1,882	1,440
Cardíaca	26	58,5	1,444	1,272
Indeterminada	45	50,0	1,695	1,754
Cardíaca	80	82,5	1,701	1,755
Cardíaca	82	90,5	1,692	1,926
Indeterminada	86	76,0	1,689	1,810
Indeterminada	94	75,5	1,716	1,573
Indeterminada	96	82,5	1,701	2,012
Indeterminada	97	90,0	1,698	1,875
Cardíaca	101	88,5	1,735	1,945
Cardíaca	102	82,0	1,726	1,864
Indeterminada	110	56,5	1,712	1,766
Indeterminada	116	43,5	1,642	1,642
Cardíaca	117	55,5	1,734	1,790
Indeterminada	118	77,5	1,722	1,685
Indeterminada	122	73,5	1,709	1,652
Cardíaca	134	41,0	1,783	0,121
Cardíaca	139	53,0	1,767	1,359
Indeterminada	140	68,5	1,671	1,930
Indeterminada	143	58,0	1,657	1,450
Indeterminada	149	51,5	1,717	2,020
Indeterminada	150	61,5	1,640	1,685
Indeterminada	151	67,0	1,654	1,740
Indeterminada	152	50,0	1,667	1,724
Cardíaca	127	56,5	1,766	1,823
Indeterminada	155	94,0	1,725	1,182
Indeterminada	156	45,0	1,765	1,250
Indeterminada	161	49,5	1,737	1,414
Indeterminada	162	68,0	1,722	1,838
Indeterminada	163	113,5	1,746	1,694
Indeterminada	166	94,0	1,741	2,000
Indeterminada	168	55,5	1,708	1,632
Indeterminada	73	40,5	1,723	1,125
Indeterminada	135	51,0	1,759	0,887
Indeterminada	157	45,0	1,765	0,928
Cardíaca	158	55,5	1,734	1,500

Anexo 9- Análise do sequenciamento das amostras posição 53 a 420. BLAST para SNP rs2074192 (Alelos C>T; ou seja, G>A no sentido sequenciado).

Amostra 20 cardíaca

ACCTTTTATTTGGAAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCATTT
GTATAATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGTCAT
TGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAAATTCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCT
TAAACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCATTATACATTTCCACACTT
ACAACTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCAT
GAAAGATGCATAATTGTCAAAGACTTATATCTTTAATTAGACCTATTTACTTTGCT
CTTATGATTTTAGGTGTATATTCCTTTTTTTTTT

Amostra 24 indeterminada

ACCTTTTATTTGGAAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCATTT
GTATAATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGTCAT
TGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAAATTCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCT
TAAACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCATTATACATTTCCACACTT
ACAACTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCAT
GAAAGATGCATAATTGTCAAAGACTTATATCTTTAATTAGACCTATTTACTTTGCT
CTTATGATTTTAGGTGTATATTCCTTTTTTTTTT

Amostra 26 cardíaca

ACCTTTTATTTGGAAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATTCATTT
GTATAATAGAAGAGGTGTATCCAATTATCCGTTTCCATTATTTGATATAAAGTCAT
TGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAAATTCTTGCCAAATATGATAACTTTGCCCT
TAAACACAGCAGTCACAAATGAATAAATGCCAACCATTATACATTTCCACACTT
ACAACTCAATTTTCCAATGGAGCTGTTGATGAACCTAATCTAGGTTGCAAGGCAT
GAAAGATGCATAATTGTCAAAGACTTATATCTTTAATTAGACCTATTTACTTTGCT
CTTATGATTTTAGGTGTATATTCCTTTTTTTTTT

Anexo 10- Informações gerais sobre os pacientes com DC na forma indeterminada sob tratamento para as comorbidades: Hipertensão, diabetes e dislipidemia.

Nº	Idade	Etnia	Forma clíica	Procedência	Peso	Altura	IMC	Classificação IMC	Hipertensão	Diabetes	Dislipidemia	Colesterol Total	HDL	Triglicérides	Glicemia
5	56	Branca	Ind	Fartura	72	1,62	27,4348422	Sobrepeso	N	N	N	159	40	151	82
6	78	Branca	Ind	Itaí	81	1,73	27,0640516	Sobrepeso	S	N	S	185	84	105	104
11	60	Parda	Ind	Itaporanga	78	1,85	22,7903579	Eutrofia	N	N	N	197	68	94	94
24	56	Branca	Ind	Coronel Macedo	74	1,75	24,1632653	Eutrofia	S	N	S	207	51	135	91
45	65	Branca	Ind	Paranapanema	100,4	1,68	35,5725624	Ob 2	N	S	S	137	48	98	104
46	70	Branca	Ind	Itaí	74	1,72	25,0132208	Sobrepeso	S	S	N	202	52	63	107
65	69	Branca	Ind	Paranapanema	80,4	1,7	27,8200682	Sobrepeso	N	S	S	185	47	134	130
86	68	Parda	Ind	Botucatu	69,3	1,69	24,2638563	Eutrofia	N	N	N	193	79	119	115
68	60	Branca	Ind	Taquarubá	94,8	1,67	33,9918964	Ob 1	S	S	S	123	27	184	139
73	48	Branca	Ind	Itaporanga	103,3	1,74	34,1194345	Ob 1	N	N	N	127	41	95	80
94	69	Branca	Ind	Itaí	84,1	1,67	30,1552583	Ob 1	S	S	N	182	56	141	148
96	61	Branca	Ind	Itaporanga	80,2	1,69	28,0802493	Sobrepeso	N	S	S	227	50	86	107
97	63	Branca	Ind	Taquarubá	70,7	1,6	27,6171875	Sobrepeso	N	S	S	126	29	286,6	154
110	62	Branca	Ind	Taquarubá	92	1,73	30,7394166	Ob 1	S	N	S	139	44	217	116
116	78	Branca	Ind	Botucatu	72,6	1,64	26,3928614	Sobrepeso	N	N	N	170	66	67	92
118	70	Branca	Ind	Taquarubá	83	1,61	32,0203696	Ob 1	S	N	S	152	75	135	94
122	68	Branca	Ind	Itaí	92	1,7	31,833391	Ob1	S	N	N	178	40	182	96
135	65	Branca	Ind	Paranapanema	64	1,62	24,3865264	Eutrofia	N	N	N	185	59	79	91
140	76	Negra	Ind	Paranapanema	67	1,72	22,6473377	Eutrofia	S	N	S	166	49	146	110
143	62	Branca	Ind	Itaí	81,5	1,66	29,5761359	Sobrepeso	S	N	N	199	46	235	94
149	61	Branca	Ind	Coronel Macedo	52	1,55	21,6441207	Eutrofia	N	N	N	203	38	101	88
150	69	Branca	Ind	Cerquillo	74	1,67	26,5337588	Sobrepeso	N	S	N	124	34	105	154
151	64	Branca	Ind	Itaí	90	1,75	29,3877551	Sobrepeso	S	N	S	143	44	81	79
152	69	Branca	Ind	Cerquillo	79	1,63	27,4756295	Sobrepeso	S	N	S	163	37	93	82,2
155	47	Branca	Ind	Conchas	62	1,65	22,7731864	Eutrofia	N	N	N	111	44	108	90
156	68	Branca	Ind	Iaras	66	1,64	24,5389649	Eutrofia	S	N	S	147	36	106	92
157	67	Branca	Ind	Botucatu	67	1,65	24,6097337	Eutrofia	N	N	S	218	44	164	93
161	53	Branca	Ind	São Manuel	73	1,78	23,0400202	Eutrofia	N	N	N	154	53	66	95
162	60	Branca	Ind	Itaporanga	73	1,67	26,1751945	Sobrepeso	N	N	N	162	54	65	99
163	67	Branca	Ind	Itararé	64	1,8	19,7530864	Eutrofia	N	N	N	199	65	49	90
166	72	Branca	Ind	Piraju	67	1,67	24,0238087	Eutrofia	S	N	S	139	42	46	94
168	77	Branca	Ind	Piraju	57	-	-	-	S	S	S	122	56	150	220

Anexo 11- Informações gerais sobre os pacientes com DC na forma cardíaca do sexo masculino, sob tratamento para as comorbidades: Hipertensão, diabetes e dislipidemia.

Nº	Idade	Etnia	Forma clínica	Procedência	Peso	Altura	IMC	Classificação IMC	Hipertensão	Diabetes	Dislipidemia	Colesterol Total	HDL	Triglicérides	Glicemia
8	63	Branca	Car	CoronelMacedo	74	1,65	27,1809	Sobrepeso	S	S	N	149	36	170	128
14	80	Branca	Car	Bolete	77,5	1,72	26,196533	Sobrepeso	S	N	N	266	40	131	93
17	67	Branca	Car	Botucatu	76,3	1,75	24,914286	Eutrofia	S	N	N	177	35	122	202
20	64	Branca	Car	Taquarituba	66	1,74	21,739445	Eutrofia	N	S	S	125	36	83	113
26	52	Branca	Car	CoronelMacedo	105	1,76	33,897211	Ob1	S	S	S	127	48	50	106
51	46	Parda	Car	Águas de Santa Bárbara	81,9	1,75	26,742857	Sobrepeso	N	N	N	176	35	144	85
52	78	Branca	Car	Itaporanga	53	1,66	19,233561	Eutrofia	N	N	S	172	38	51	91
101	60	Branca	Car	Piraju	75,9	1,58	30,403781	Ob1	S	N	N	205	49	133	118
102	63	Branca	Car	Taquarituba	90	1,76	29,054752	Sobrepeso	N	N	N	129	51	138	100
117	70	Branca	Car	Parapanema	80,5	1,61	31,055301	Ob1	S	N	S	212	48	185	112
127	74	Branca	Car	Guareí	84	1,74	27,744748	Sobrepeso	S	N	S	140	34	103	99
134	72	Branca	Car	Avaré	79	1,7	27,33564	Sobrepeso	S	N	S	201	49	79	103
139	74	Branca	Car	Taquarituba	53	1,59	20,964361	Eutrofia	S	N	N	143	64	57	95
158	57	Parda	Car	Itai	58	1,7	20,069204	Eutrofia	S	N	S	146	69	91	85
82	72	Parda	Car	Piraju	84,6	1,76	27,311467	Sobrepeso	S	N	S	173	30	-	107
80	67	Branca	Car	Parapanema	75	1,62	28,577961	Sobrepeso	S	S	S	159	40	151	82

Anexo 12- Alinhamento no Blastn (primeira página do BLASTn) para o amplicon de 367 bp, obtido por sequenciamento de Sanger. O alinhamento foi feito com o NG_012575.1 do gene ACE2, com o rs2074192.

The screenshot displays the NCBI BLASTn web interface. The browser's address bar shows the URL: `blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=me...`. The page header includes the NIH logo and the text "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information". Below the header, the "BLAST® » blastn suite" section is visible, with tabs for "blastn", "blastp", "blastx", "tblastn", and "tblastx". The "blastn" tab is selected, and the "Align Sequences Nucleotide BLAST" page is shown. The "Enter Query Sequence" section contains a text area with a FASTA sequence: `ACCTTTTATTGGAAATATTACTATAGAGACTTGGTCATAGGACCTGATT
CATTGTATATAGAGAGGGTATCCAAATATCCGTTCCATTATTGATA
TAAAGTCATTGTAGATGTACTCTGACAGAAGGGAATCTTGCCAAATAT
GATAAGCTTTGCCCTTAAACACAGCAGTCACAAATGAATGAATGCCAGCCA`. Below this, there are fields for "Query subrange" (From and To) and a "Job Title" field. The "Enter Subject Sequence" section has a text area with the accession number "NS_012575" and a "Subject subrange" field. The "Program Selection" section shows "Optimize for" with three radio buttons: "Highly similar sequences (megablast)", "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)", and "Somewhat similar sequences (blastn)". The "blastn" option is selected. At the bottom, there is a "BLAST" button and a checkbox for "Show results in a new window". The browser's taskbar at the bottom shows several open files: "seqdump.txt", "RCC5MNR4114-Alli....txt", and "nota enfe 2022.xlsx". The system clock in the bottom right corner shows "10:08".

Anexo 13 *Dot Plot* do alinhamento no Blastn (quarta página do BLASTn) para o *amplicon* de 367 bp, obtido por sequenciamento de Sanger. O alinhamento foi feito com o NG_012575 do gene ACE2, que continha o rs2074192.

