

GILSON ICHIKAWA

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DA REGIÃO
PROMOTORA DO GENE RAGE COM MARCADORES DE RISCO PARA DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA EM INDIVÍDUOS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1.**

**Monografia apresentada à disciplina de
Estágio em Bioquímica como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, Curso de Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof.º Dr. Emanuel Maltempi de
Souza**

Co-orientador: Prof.º Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2008

GILSON ICHIKAWA

**INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DA REGIÃO
PROMOTORA DO GENE RAGE COM MARCADORES DE RISCO PARA DOENÇA
ARTERIAL CORONARIANA EM INDIVÍDUOS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1.**

**Monografia apresentada à disciplina de
Estágio em Bioquímica como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, Curso de Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof.º Dr. Emanuel Maltempo de
Souza**

Co-orientador: Prof.º Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2008

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>DIABETES MELLITUS</i>	4
3.2 DIABETES E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA.....	5
3.3 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES).....	6
3.4 AGES E EFEITOS ASSOCIADOS.....	8
3.5 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA.....	10
3.5.1 Estrutura do Receptor RAGE.....	10
3.5.2 Polimorfismos do gene RAGE e relação com o <i>Diabetes mellitus</i>	13
3.6 POLIMORFISMOS DO GENE RAGE E RELAÇÃO COM O <i>DIABETES MELLITU</i>	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 AMOSTRA	16
4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	16
4.2.1 Eletroforese em gel de agarose	17
4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	18
4.3.1 Genotipagem dos polimorfismos da região promotora do gene RAGE com a enzima <i>Tsp509I</i> para restrição da região promotora de RAGE.....	18

4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos da região promotora do gene RAGE com a enzima <i>AluI</i> para restrição da região promotora de RAGE.....	19
4.3.3 Identificação dos tamanhos dos fragmentos de restrição.....	19
4.4 QUANTIFICAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	19
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	20
5. RESULTADOS	21
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	21
5.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	23
5.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO POLIMORFISMO -429 T>C	24
5.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO POLIMORFISMO -374 T>A	25
5.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE COM MARCADORES DE RISCO PARA DAC	26
5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429T>C E A CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HBA _{1c})	27
5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -374T>A E A CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HBA _{1c})	28
6. DISCUSSÃO	29
6.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	30
6.2 PCR-RFLP DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE	31
6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS E MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	31
7. CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AFGP	1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil-pirrol
AGEs	produtos finais de glicação avançada (<i>Advanced Glycation End Products</i>)
AV	amplitude de variação
CML	N ^ε -(carboximetil)lisina
DAC	doença arterial coronariana
DM1	<i>diabetes mellitus</i> tipo 1
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DN-RAGE	RAGE sem a cauda citosólica (<i>dominant negative RAGE</i>)
DP	desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
F-AGEs	ages fluorescentes
FFI	2-2(furoil)-4(5)-(2furanil)-1H-imidazol
HbA_{1c}	hemoglobina glicada
HDL-C	lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IL-1 alfa	Interleucina 1 alfa
IL-6	Interleucina -6
LDL-C	lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
NF-κB	fator nuclear-κB (<i>nuclear factor κB</i>)
PBS	tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RAGE	receptor para produtos finais de glicação avançada (<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>)
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SNP	polimorfismo de único nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
sRAGE	RAGE solúvel (<i>soluble RAGE</i>)

TBE	tampão <u>T</u> ris- <u>B</u> orato- <u>E</u> DTA
TNFα	fator de necrose tumoral α (<u>T</u> umour <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor)
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA QUÍMICA DE AGES	7
FIGURA 2	MODELO ESQUEMÁTICO DA GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS, FORMAÇÃO DE AGES E REAÇÃO DE <i>CROSS-LINK</i> ENTRE PROTEÍNAS.....	8
FIGURA 3	PRINCIPAIS EFEITOS DA INTERAÇÃO AGE-RAGE RELACIONADAS COM COMPLICAÇÕES DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	10
FIGURA 4	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR RAGE	11
FIGURA 5	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DO GENE RAGE	12
FIGURA 6	MAPA DE POLIMORFISMOS DO GENE RAGE	13
FIGURA 7	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE	23
FIGURA 8	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP PARA O POLIMORFISMO -429T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	24
FIGURA 9	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP PARA O POLIMORFISMO -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	25
FIGURA 10	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO -429T>C E CONCENTRAÇÕES DE HBA _{1c}	27
FIGURA 11	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO -374T>A E CONCENTRAÇÕES DE HBA _{1c}	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA17
TABELA 2	PROGRAMA DO TERMOCICLADOR UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA.....17
TABELA 3	CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA <i>Tsp509I</i>18
TABELA 4	CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA <i>AluI</i>19
TABELA 5	DADOS ANTROPOMÉTRICOS DA AMOSTRA EM ESTUDO21
TABELA 6	VALORES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA A AMOSTRA EM ESTUDO22
TABELA 7	DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E MARCADORES DE RISCO PARA DAC, CONTROLE GLICÊMICO E AGEs FLUORESCENTES PARA OS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DO GENE RAGE.....26

RESUMO

A hiperglicemia característica do diabetes resulta em um aumento na produção dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) que liga-se a receptores específicos, particularmente o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Esta interação AGE-RAGE ativa a transcrição de outros genes, resultando assim no aumento da resposta inflamatória, e de moléculas associadas à aterogênese e trombogênese. Mais de 30 polimorfismos já foram descritos para o gene RAGE, entre eles estão dois polimorfismos funcionais da região promotora de RAGE, o -429T>C e o -374T>A. A presença destes polimorfismos acarreta na alteração dos níveis de expressão desta proteína, tornando-os interessantes em estudos associados a patologias. O objetivo deste estudo foi investigar se há associação entre a presença destes polimorfismos com marcadores de risco para doença arterial coronariana (DAC) em 98 pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) (38,8% homens) com idade de 24,2±6,9 anos (média±DP) e composição étnica de Euro-Brasileiros (72,5%) e Afro-Brasileiros (27,5%). A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP utilizando as enzimas *A**l**u**I* e *Tsp*509I. A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) foi quantificada por HPLC e o perfil lipídico determinado em sistema automatizado com química seca. Os produtos de glicação avançada foram quantificados por fluorescência (F-AGEs) com Ex370nm/Em440nm. Para o polimorfismo -429T>C os parâmetros bioquímicos foram comparados quanto a ausência do alelo C (genótipo TT, n=66), contra a presença do alelo C (genótipos TC+CC, n=32), sendo os valores de p (p > 0,05) respectivamente: HbA_{1c} (%) p = 0,383, Colesterol (mg/dL) p = 0,878, HDL-C (mg/dL) p = 0,576, LDL-C (mg/dL) p = 0,827, Triglicérides (mg/dL) p = 0,601, F-AGEs (UA x10³) p = 0,997. Para o polimorfismo -374T>A os parâmetros bioquímicos foram comparados quanto a ausência do alelo A (genótipo TT, n=43), contra a presença do alelo A (genótipos TA+AA, n=55), sendo os valores de p (p > 0,05) respectivamente: HbA_{1c} (%) p = 0,675, Colesterol (mg/dL) p = 0,336, HDL-C (mg/dL) p = 0,381, LDL-C (mg/dL) p = 0,361, Triglicérides (mg/dL) p = 0,593, F-AGEs (UA x10³) p = 0,131. Outra associação feita entre os genótipos e o controle glicêmico destes pacientes teve como resultados -429T>C (p = 0,359) e -374T>A (p = 0,229). Concluímos que, não foi observada associação (P>0,05) entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora do gene RAGE com as concentrações séricas de marcadores de risco para DAC ou com o controle glicêmico (HbA_{1c}) em diabéticos tipo 1.

Palavras-chave: receptor RAGE; SNP, *Diabetes mellitus* tipo 1

ABSTRACT

The hyperglycemic characteristics from diabetes results in a increase production of the advanced glycation end products (AGEs) that bind to specific receptors, particularly the receptor for advanced glycation end products (RAGE). This interaction AGE-RAGE activates the transcription of other genes, thus resulting in the increase of inflammatory response, and molecules associated with atherogenesis and thrombogenesis. More than 30 polymorphisms has been describe for the RAGE gene, among them there are two functional polymorphism of the promoter region of RAGE, the -429T>C and the -374T>A. The presence of this polymorphisms results in an alteration of the expression levels of this protein, making them interesting in studies with diseases. The aim of this study was investigate whether there is relationship between the presence of this polymorphisms with risk factors for coronary artery disease in 98 patients with *Diabetes mellitus* type 1 (DM1) (38,8% man), 24,2±6,9 years old (average±DP) and ethnic composition of Euro-Brazilian (72,5%) and Afro-Brazilian (27,5%). The genotyping was performed by PCR-RFLP using the enzymes *AluI* and *Tsp509I*. The glycated hemoglobin (HbA_{1c}) was quantified by HPLC and the lipid profile determined in automatized system with dry chemistry. The Glycation end products were quantified by fluorescence (F-AGEs) with Ex370nm/Em440nm. For the polymorphism -429T>C the biochemical parameters were compared on the absence of the C allele (genotype TT, n = 66), against the presence of the C allele (genotypes CT+CC, n = 32), the values of p (p > 0.05) respectively: HbA_{1c} (%) p = 0383, Cholesterol (mg / dL) p = 0878, HDL-C (mg / dL) p = 0576, LDL-C (mg / dL) p = 0827, Triglicérides (mg / dL) p = 0601, F-AGEs (AU x103) p = 0997. For the polymorphism -374T>A The biochemical parameters were compared on the absence of the A allele (genotype TT, n = 43), against the presence of the A allele (genotypes TA +AA, n = 55), the values of p (p > 0.05) respectively: HbA_{1c} (%) p = 0675, Cholesterol (mg / dL) p = 0336, HDL-C (mg / dL) p = 0381, LDL-C (mg / dL) p = 0361, Triglicérides (mg / dL) p = 0593, F-AGEs (AU x103) p = 0131. Another association made between genotypes and glycemetic control of these patients had the results -429T> C (p = 0359) and -374 T> A (p = 0229). In brief, no association was observed (P > 0.05) between the polymorphism -429T> C-374T> of the promoter region of RAGE gene with the serum concentrations of risk markers for DAC or the glycemetic control (HbA_{1c}) in diabetes type 1.

Keywords: receptor RAGE; SNP, Diabetes mellitus type 1.

1. INTRODUÇÃO

Existem mais de 100 milhões de pessoas com diabetes no mundo (1% a 8% da população total), e as projeções apontam para um aumento significativamente deste número em futuro próximo (GIUSEPPE et al., 2003). O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) corresponde a cerca de 10% dos casos de diabetes e caracteriza-se por um déficit de insulina, isso devido à destruição da célula beta do pâncreas, o que leva a necessidade de injeções diárias de insulina exógena para o controle da doença (American Diabetes Association, 2007). O *Diabetes mellitus* é reconhecido como um importante fator independente para o risco cardiovascular desde a publicação da primeira investigação epidemiológica de larga escala nos anos 70 (KANNEL E MCGEE, 1979; AUSTIN et al 1998). Esta patologia promove, além de alterações nos metabolismos de carboidratos e lípidos, o aumento da concentração sérica dos produtos de glicação avançada (AGEs, *Advanced Glycation End products*).

Os AGEs são um grupo heterogêneo de compostos que podem ser responsáveis por diversos efeitos fisiopatológicos (HUDSON et al., 1998). A formação de AGEs ocorre pela natureza reativa de açúcares redutores, que reagem de forma não-enzimática com grupos amino de proteínas, produzindo uma ligação irreversível (HUDSON et al., 2002); a velocidade desta reação é diretamente proporcional à concentração e ao tempo de exposição à glucose.

O receptor mais estudado para os produtos finais de glicação avançada – RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) é uma proteína multiligante que ao interagir com AGEs promove uma transdução de sinal, ativando a transcrição de várias proteínas intracelulares, resultando no aumento da resposta inflamatória e de moléculas associadas à aterogênese e trombogênese (SCHMIDT et al., 2000; HUDSON et al. 2002) .

O gene RAGE está localizado no cromossomo 6p21.3, muito próximo ao complexo principal de histocompatibilidade (SUGAYA et al., 1994; GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769) e, até o momento, já foram identificados cerca de 50 polimorfismos deste gene. Os polimorfismos -429T>C e -374T>A e uma deleção de 63 pb (-407 a -345) são funcionais e estão localizados na região

promotora do gene RAGE, e a presença do alelo -429C, -374A e a 63Del resultam em aumento significativo da transcrição *in vitro* de RAGE (HUDSON et al., 2001).

Os citados polimorfismos funcionais de RAGE são de particular interesse no estudo de associação entre estes SNPs e o diabetes tipo 1, desde que podem estar envolvidos no aumento de risco das complicações do diabetes ou mesmo como fatores de proteção a estes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a possível associação dos polimorfismos da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) - 429T>C e -374T>A com marcadores de risco para a doença arterial coronariana e controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 1 (DM1).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar através da reação em cadeia de polimerase (PCR) a região promotora do gene RAGE;
- Caracterizar genotipicamente os polimorfismos -429T>C e -374 T>A da região promotora do gene RAGE através da reação de PCR-RFLP utilizando as enzimas de restrição *Alu I* e *Tsp 509 I*, respectivamente;
- Identificar os fragmentos de restrição dos polimorfismos -429T>C e -374 T>A através de eletroforese em gel poliacrilamida;
- Quantificar as concentrações dos produtos de glicação avançada séricos por fluorescência (F-AGEs);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é definido como um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por uma rápida elevação da concentração de glicose no plasma sanguíneo causada por uma relativa ou absoluta deficiência no hormônio insulina (VIGNESHWARAN et al., 2005). O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) corresponde a cerca de 10% dos casos totais de diabetes, é uma condição na qual a destruição das células beta pancreáticas geralmente conduz a uma deficiência absoluta de insulina (DEVENDRA et al., 2004). Esta patologia é caracterizada também pela necessidade de injeções diárias de insulina em seus acometidos .

O DM é uma patologia que esta em primeiro plano no planejamento de políticas de saúde pública, quer pelo número de doentes, quanto pela possibilidade de melhora na expectativa e qualidade de vida dos afetados quando têm suporte no diagnóstico precoce, indicadores da evolução da doença e tratamento. Os custos relacionados ao diabetes foram estimados em 98 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos, com valores similares para o Reino Unido, quando se considera fatores que envolvem a perda de produtividade, a internações prolongadas, cirurgias e tratamentos complexos. O sistema de saúde norte americano prevê que os custos para um indivíduo com diabetes é quatro vezes maior que aquele não diabético, e o Reino Unido gasta cerca de 10% do seu orçamento nacional para saúde com o diabetes. Dados para comparação com a situação brasileira não foram encontrados (SACKS *at al.*, 2002). A primeira campanha nacional de triagem para diabetes realizada em 2001 e patrocinada pelo governo Brasileiro identificou 2,9 milhões de suspeitos de DM, 14,6% da população.

O diagnóstico laboratorial do paciente com diabetes é realizado pela quantificação da concentração de glicose sérica em jejum ou após uma sobrecarga de glicose, também designada curva glicêmica (ADA., 2005). A glicemia em jejum como parâmetro diagnóstico para diabetes (≥ 126 mg/dL em mais de uma ocasião) é referendado, entre outros, pela Associação Americana de Diabetes e Sociedade Brasileira de Diabetes (American Diabetes Association, 2007).

A gravidade e precocidade das complicações cardiovasculares, particularmente das artérias coronárias, são significativamente aumentadas nos pacientes diabéticos (LAAKSO *et al.*, 1999). O DM representa um fator de risco cardiovascular independente e a macroangiopatia é responsável por 80% da mortalidade na população diabética (AUSTIN *et al.*, 1998). A aterosclerose é a mais freqüente causa de morte prematura nesse grupo de pacientes, duplicando o risco de doença coronária, triplicando o de acidente vascular cerebral e quadruplicando a possibilidade de ocorrência de insuficiência vascular periférica sintomática. A associação entre doença aterosclerótica e DM pode ser atribuída a uma série de características, que facilitam a aterogênese nesse grupo de pacientes, como a concomitância de outros fatores de risco, dos quais a obesidade, hipertensão arterial sistêmica, os níveis mais elevados de fibrinogênio e as dislipidemias são os mais importantes.

Uma relação entre o diagnóstico de DM e alterações no perfil lipídico é muito freqüente, em especial com os níveis de triglicérides.

3.2 DIABETES E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

O DM é associado a inúmeras complicações clínicas de longo prazo que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade da doença, apesar das medidas disponíveis para seu controle metabólico (BAYNES *et al.* 2000). Estas complicações podem ser divididas em complicações macro-vasculares, que incluem a doença arterial coronariana, aterosclerose e doença vascular periférica; e complicações micro-vasculares que incluem retinopatia, nefropatia, e defeitos neurovasculares associados a neuropatia autonômica. Tais complicações podem manifestar-se clinicamente como enfarte do miocárdio, angina, cegueira, insuficiência renal em fase terminal, insuficiência cardíaca congestiva, condução defeituosa nos nervos e dificuldade na cicatrização de feridas (WAY *et al.*, 2001). O Diabetes tem sido reconhecido por muito tempo como um fator de risco independente para a doença arterial coronariana (DAC), sendo a morbidade e a

mortalidade devido a DAC duas a quatro vezes maior do que nos sujeitos não-diabéticos. (JACOBY e NESTO., 1992; KANNEL e MC GEE., 1979).

3.3 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)

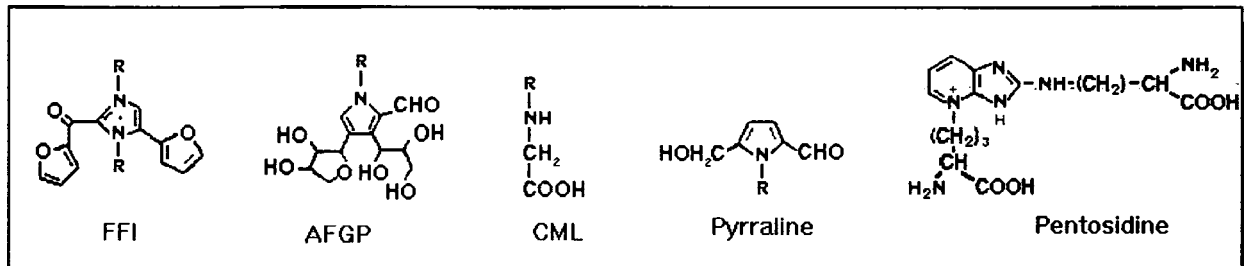
Os açúcares redutores como a glicose, são capazes de reagir com proteínas de forma não enzimática em reações denominadas de glicação, glucosilação ou glicosilação (MIYATA et al., 1997). Esta reação tem início com a formação reversível de uma base de Schiff entre o açúcar e o aminogruppo da proteína que evolui para formar um intermediário estável, este designado de produto de Amadori. Após uma cascata de condensações, rearranjos, fragmentações, modificações oxidativas e reações através de intermediários dicarbonilas, que podem demandar meses, formam-se os produtos de glicação avançados ou AGEs (*Advanced Glycation End products*), também conhecidos como produtos avançados de Maillard (NAGARAJ et al., 1996, BOOTH, et al., 1997).

Os produtos finais de glicação avançada são um grupo heterogêneo de compostos responsáveis por efeitos adversos, incluindo redução de atividade enzimática, danos a ácidos nucléicos, formação de pontes (*cross-linking*) entre proteínas, além de indução de vias citotóxicas (HUDSON et al., 1998).

A taxa de formação de produtos de Amadori é diretamente proporcional à concentração e ao tempo de exposição à glicose, por isso, as complicações associadas ao diabetes (doenças micro-vasculares e macro-vasculares) têm sido relacionadas à formação dos AGEs (HUDSON et al., 2001). Esta seqüência de reações é lenta e espontânea, podendo demorar semanas ou meses (HARDING, 1985; HUTTUNEN, 1996). A glicose é o açúcar preferencial para o processo de glicação *in vivo* por ser o carboidrato mais abundante no plasma, no entanto, outros açúcares também podem levar à formação de produtos de glicação. Evidências sugerem que as aldoses intracelulares (precursores de AGEs como frutose, glicose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato), reagem mais rapidamente com proteínas que a glicose, reduzindo o tempo de formação. *In vitro*, o nível de AGEs derivados de frutose depois de cinco dias de reação é dez vezes maior que o de AGEs derivados de glicose (MCPHERSON, 1988).

Um grande número de AGEs (Figura 1) têm sido isolado ou sintetizado *de novo*. Os AGEs mais representativos são: N^ε-carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, pentosidina, pirralina, AFGP (1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol) e FFI (2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-*H*-imidazol).

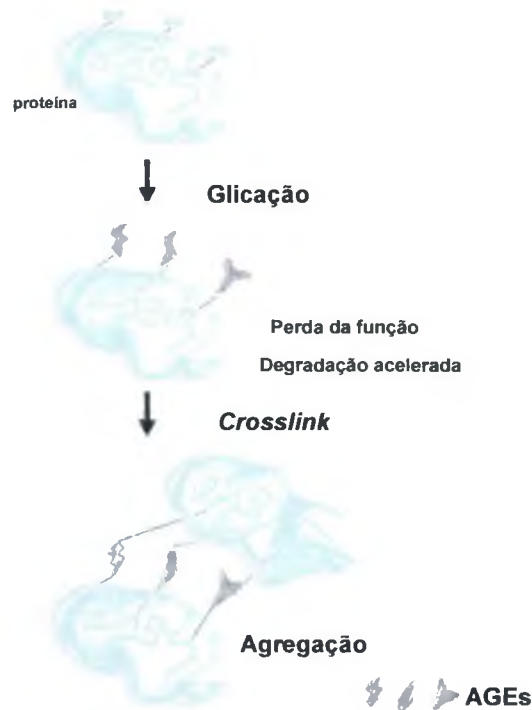
FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE AGEs.



FFI: 2-2(furoil)-4(5)-(2furanil)-1H-imidazol; AFGP: 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol; CML: carboximetil lisina; pyrrole: pirralina e pentosidine: pentosidina (HUTTUNEN, 1996).
 Fonte: HUTTUNEN, 1996

A formação de reações cruzadas entre os AGEs produz estruturas que tendem a gerar intermediários reativos de oxigênio que interagem com estruturas presentes na superfície celular (BROWNLEE et al., 1988; VLASSARA et al., 1994). Proteínas glicadas, portanto, podem participar destas reações cruzadas, sendo que este processo de polimerização ocorre mesmo na ausência de glucose livre (EBLE et al., 1983). A Figura 2 mostra esquematicamente o processo de reações cruzadas com proteínas ligadas a AGEs.

FIGURA 2 - MODELO ESQUEMÁTICO DA GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS, FORMAÇÃO DE AGES E REAÇÃO DE *CROSS-LINK* ENTRE PROTEÍNAS.



Fonte: LAPOLLA *et al.* (2005).

Os produtos de glicação avançados (AGEs) estão intimamente relacionados às complicações do paciente com diabetes como o desenvolvimento da doença arterial coronária e a insuficiência renal.

3.4 AGEs E EFEITOS ASSOCIADOS

A formação de AGEs causa alterações fisiopatológicas via três mecanismos (HUDSON *et al.*, 2002): (1) a formação de AGEs na matriz extracelular prendendo proteínas, e eventualmente, estreitando o lúmen; (2) a formação de AGEs intracelularmente, alterando estrutura e função de proteínas e; (3) AGEs interagem com receptores específicos, ativando vias pró-inflamatórias e pró-trombóticas.

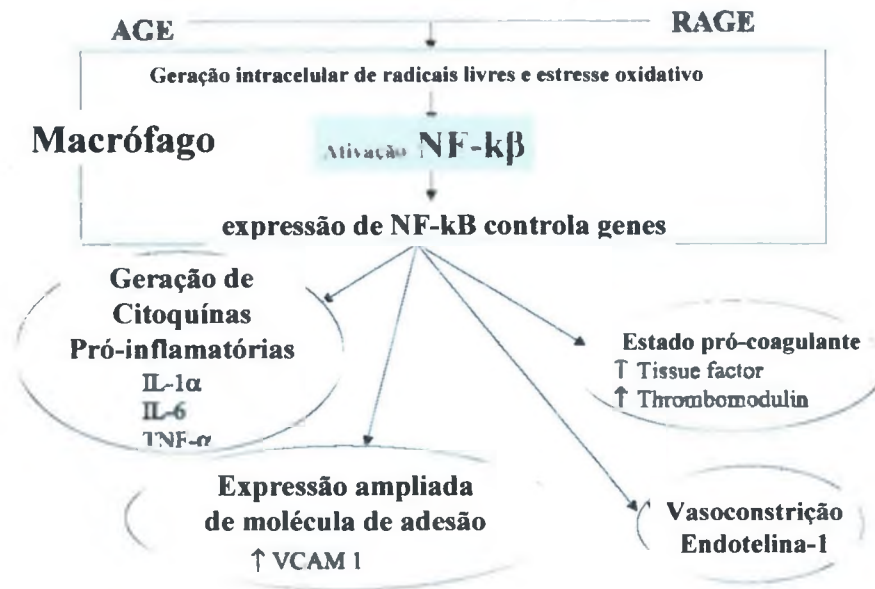
A ligação de AGEs com o receptor RAGE tem demonstrado em vários trabalhos resultar em múltiplos efeitos como (adaptado de Hudson *et al.* 1998):

- Disfunção celular do subendotélio e ação próinflamatória (HOFMANN, *et al.*, 1999)
- Estresse oxidativo e geração de radicais livres de Oxigênio(CHAPPEY *et al.* 1996),
- Ativação celular do Fator Nuclear κ -B (NF- κ B) um marcador de estresse oxidativo. Esta ativação por sua vez induz a expressão de:
- Fator tecidual procoagulante (YAMAGISHI *et al.*, 1998),
- Endotelina-1 vasoconstritora, e
- Aumento nos níveis da molécula-1 de adesão celular vascular (vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1), um marcador de aterosclerose.

Todos os fatores citados podem estar relacionados aos eventos micro e macrovasculares apresentados pelo paciente com diabetes (BONNARDEL-PHU *et al.*, 1999). Vários trabalhos tem relacionados os RAGE como apresentando um papel central nas alterações vasculares e inflamatórias do paciente com diabetes (SCHMIDT & STERN, 2000).

A Figura 3 esquematiza os principais efeitos da interação AGE-RAGE.

FIGURA 3 - PRINCIPAIS EFEITOS DA INTERAÇÃO AGE-RAGE RELACIONADAS COM COMPLICAÇÕES DO *DIABETES MELLITUS*.



Fonte: LAPOLLA *et al.* (2005).

3.5 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

3.5.1 Estrutura do Receptor RAGE

O receptor para os produtos finais de glicação avançada – RAGE – é uma proteína de aproximadamente 45 kDa originalmente isolada do endotélio pulmonar bovino (SCHMIDT *et al.*, 1992). O RAGE é um membro da superfamília das imunoglobulinas da superfície celular, cuja expressão é ativada em diversas patologias, da aterosclerose à doença de Alzheimer (revisão em SCHMIDT *et al.*, 1999).

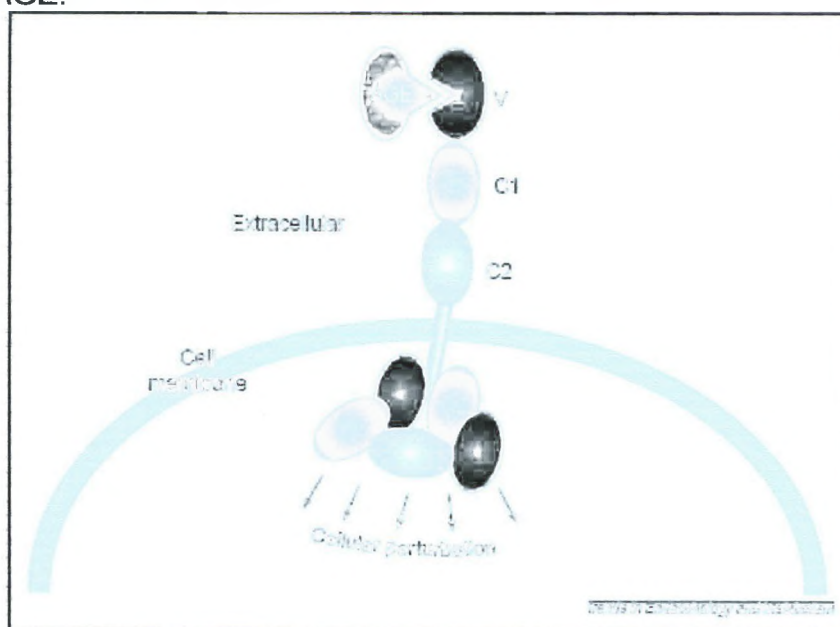
O RAGE é expresso em uma variedade de tipos celulares, mas em baixos níveis em homeostase. Em situações de aumento da ativação celular ou estresse como no desenvolvimento normal, diabetes, inflamação e doença de Alzheimer, a expressão do RAGE é extraordinariamente aumentada nas células afetadas (SCHMIDT & STERN, 2000).

A região extracelular do RAGE consiste de um domínio de imunoglobulina do tipo V (variável) seguido por dois domínios de imunoglobulina do tipo C (constante) estabilizados por pontes de enxofre internas entre resíduos de cisteína. O domínio V inclui dois supostos sítios para produtos de glicação N-ligados (Huttunen, 1996). A figura 4 mostra uma descrição esquemática do RAGE e sua interação com os AGEs no domínio V (SCHMIDT & STERN, 2000).

Outras proteínas que ligam AGEs, como os receptores de *scavenger* de macrófagos, as proteínas P60 e P90 e a galectina-3 apresentam uma interação com os AGEs bem menos caracterizada. Além disto nenhuma das proteínas citadas foi identificada como um receptor com tradução de sinal para estas estruturas modificadas (SCHMIDT & STERN, 2000).

Embora o RAGE foi caracterizado como receptor para AGEs heterogêneos, obtidos de preparação *in vitro* ou isolados a partir de humanos, estudos recentes tem identificado que o RAGE é um receptor com tradução de sinal para aductos carboxi(metil)lisina (CML, N^ε-(carboximetil)lisina), o mais prevalente dos AGEs identificado até o presente *in vivo* (SCHMIDT *et al.* 2000; SCHMIDT E STERN, 2000).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR RAGE.



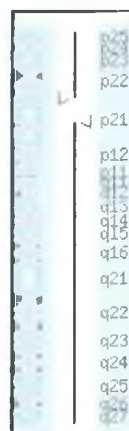
Fonte: SCHMIDT e STERN, 2000.

Três formas do receptor RAGE resultantes de *splicing* alternativo são conhecidas (DING et al., 2005). Duas isoformas de RAGE foram detectadas, uma de 45 kDa (RAGE) e outra de 35 kDa (NEEPER et al., 1992). Esta última forma não apresenta a região transmembrana e é o chamado RAGE solúvel (sRAGE) (SCHMIDT et al., 1994). A proteína sRAGE é uma provável supressora da ativação e sinalização de RAGE, visto que seqüestra seus ligantes, evitando a interação ligante-RAGE e seus efeitos (DING et al., 2005).

Segundo SCHMIDT et al. (2000) existe ainda uma forma truncada de RAGE que não apresenta a cauda citosólica (DN-RAGE, *dominant negative*). Da mesma forma que o RAGE nativo, a forma truncada interage normalmente com os ligantes, porém não induz ativação celular e, portanto, compete com RAGE pelos ligantes, reduzindo seus efeitos deletérios.

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) humano foi mapeado no cromossomo 6p21.3 (Figura 5), e uma análise da área próxima determinou a proximidade deste gene com o complexo maior de histocompatibilidade classe II e classe III (SUGAYA *et. al.*, 1994, GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769). Este gene é composto de 11 exons e 10 íntrons, sendo o domínio de imunoglobulina do tipo V codificado pelos segundo e terceiro exons (HUTTUNEN, 1996).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DO GENE RAGE.

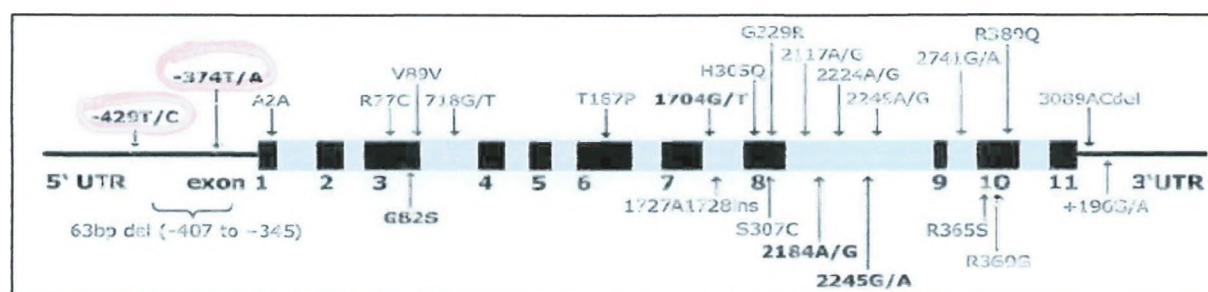


Fonte: SCHMIDT e STERN, 2000.

3.5.2 Polimorfismos do gene RAGE e relação com o *Diabetes mellitus*.

O tipo mais comum de variação no DNA genômico é chamado de polimorfismo de um único nucleotídeo ou SNP (*single-nucleotide polymorphism*) é muito abundante e esta associado com a diversidade populacional, individualidade, susceptibilidade a doenças e a resposta individual a medicamentos (SHASTRY, 2002). A figura 6 ilustra os principais polimorfismos encontrados no gene RAGE.

FIGURA 6 - MAPA DE POLIMORFISMOS DO GENE RAGE.



Variantes mais comuns marcadas em negrito; polimorfismos analisados neste estudo circulados em vermelho.

Fonte: Adaptado de KANKOVÁ *et al.*, 2005

Uma região do gene RAGE cujas mutações estão sendo associadas à patologias é a região promotora. HUDSON *et al.* (2001) descreveram oito novos polimorfismos na região promotora, sendo que o mais freqüente, o polimorfismo -429 T/C, mostrou o alelo C aumentado no grupo de diabéticos tipo 2 com retinopatia comparado a controles normais. HUDSON *et al.* (2001) demonstraram também o efeito dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e 63pb Del na regulação da expressão do gene RAGE, ao qual indicou que a presença dos alelos -429C, -374A e a deleção de 63 pares de base aumentou significativamente a transcrição do gene RAGE *in vitro*.

PETTERSSON-FERNHOLM *et al.* (2003) examinaram a associação entre os polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora de RAGE e DAC em 996 pacientes terminais com DM1. Pacientes com o genótipo A/A do polimorfismo -374T>A tiveram uma menor freqüência de DAC, infarto agudo do miocárdio e de doença vascular periférica, do que naqueles com genótipo T/A + T/T indicando

assim um possível papel de proteção do genótipo -374 A/A em relação ao desenvolvimento destas patologias.

FALCONE et al. (2005) analisaram a relação entre o polimorfismo -374T>A contra a severidade da aterosclerose coronária em pacientes caucasianos que possuíam histórico comprovado angiograficamente de doença arterial coronariana, este estudo sugere que o polimorfismo -374T>A de RAGE é um dos prováveis candidatos genotípicos determinantes em aterosclerose coronariana.

FALCONE et al. (2004) analisaram a relação entre o polimorfismo -374T>A e doença arterial coronariana e os resultados indicaram que o polimorfismo -374T>A pôde reduzir a susceptibilidade para DAC, exercendo assim um efeito protetor contra no risco coronário.

JIXIONG et al. (2003) analisaram a associação dos polimorfismos -429T>C, e -374T>A da região promotora de RAGE com retinopatia ligada ao diabetes, indicando não haver associação entre os polimorfismos -429T>C, e -374T>A com a retinopatia ligada ao diabetes em pacientes chineses com diabetes do tipo 2.

KIRBIS et al. (2004) analisaram a associação dos polimorfismos -429T>C, e -374T>A da região promotora de RAGE com DAC, não encontrando relação tanto do polimorfismo -429T>C quanto do polimorfismo -374T>A com a DAC em população eslovena com diabetes do tipo 2.

SANTOS et al., (2005) investigou a relação entre os polimorfismos -429T>C, -374T>A além da deleção de 63pb inserção/deleção (I/D) pares de base da região promotora de RAGE com as patologias: retinopatia e nefropatia do diabetes e cardiopatia isquêmica. Nenhuma associação foi feita entre os alelos -429C, -374A e 63pb Del e as patologias retinopatia e nefropatia do diabetes e cardiopatia isquêmica em Euro-Brasileiros com diabetes do tipo 2. Entretanto, o alelo -374A foi associado com a diminuição de se desenvolver cardiopatia isquêmica em população de Afro-Brasileiros com diabetes do tipo 2.

SULLIVAN et al. (2005) estudou a relação dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e a deleção de 63pb da região promotora de RAGE mais o polimorfismo G82S do exon 3, com a herdabilidade de resistência a insulina, indicando que o gene RAGE pode afetar o desenvolvimento da resistência a insulina, ou esta em desequilíbrio de ligação com algum locus envolvido neste processo.

Pelo exposto, a investigação dos polimorfismos da região promotora de RAGE em diabéticos tipo 1 pode propiciar a detecção do envolvimento deste receptor com as complicações clínicas associadas à patologia ou mesmo fornecer informação sobre um efeito protetor. Também, o estudo proposto poderá ampliar a compreensão da função do gene RAGE em humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foram estudados 98 pacientes com *Diabêtes mellitus* tipo 1 provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em amostra cedida pela Prof. Dra Vânia M. Alcântara do Departamento de Patologia Médica da UFPR. Foram excluídos do estudo dois pacientes que apresentaram a deleção de 63 pb (63Del) devido a esta mutação se sobrepor ao polimorfismo -374T>A. Este estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR–CEP-HC nº 071.EXT.025/2003-02.

4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). O fragmento da região promotora do gene RAGE contendo os polimorfismos em estudo (-429T>C e -374T>A), foi amplificado através de PCR utilizando como oligonucleotídeos iniciadores os descritos por HUDSON et al. (2001) que geram um amplicon de 344 pb, correspondente à região -590 à -246 da região promotora de RAGE:

- Prom F: 5'-GGG GGC AGT TCT CTC CTC-3';
- Prom R: 5'-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-3'.

As condições da reação de PCR para amplificação do fragmento da região promotora do gene RAGE estão descritas nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA.

REAGENTES E DNA	Concentração na reação	Volume (μL)
DNA molde ($\sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	$\sim 100 \text{ ng}$	1,0
Tampão Taq (10X)	1 X	1,0
MgCl_2 (50 mM)	1,5 mmol/L	0,3
dNTP (5mM)	0,2 mmol/L	0,4
Oligonucleotídeos Iniciadores (5 pmol/ μL cada)	10 pmol (cada)	2,0
Taq DNA polimerase (5U/ μL)	2,5 U	0,5
Água Reagente tipo 1 estéril	----	4,8
	Volume final	10 μL

Tampão *Taq* 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

TABELA 2 - PROGRAMA DO TERMOCICLADOR UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA.

NÚMERO DE CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TEMPO
1x	Desnaturação	94	2 minutos
34x	Desnaturação	94	40 segundos
	Anelamento	60	40 segundos
	Extensão	72	45 segundos
1x	Extensão Final	72	10 minutos

4.2.1 Eletroforese em gel de agarose

A quantidade e a qualidade do produto de PCR obtido foram determinadas através de eletroforese submarina em gel de agarose a 1,5% (cuba Horizon 58, Life Technologies a 60 Volts e 36 mA durante 1 hora) em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Foram aplicados no gel de eletroforese 2 μL ($\sim 20\text{ng}$) de produto de PCR misturados com 3 μL de solução corante (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%). O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens foram obtidas com câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP).

4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GÊNE RAGE

A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*) após a obtenção dos produtos de amplificação gerados pela PCR com o intuito de determinar os genótipos dos polimorfismos. Para isso são utilizadas enzimas de restrição que cortam em sítios específicos do DNA gerando diferentes padrões de bandas para os fragmentos com ou sem o polimorfismo.

4.3.1 Genotipagem dos polimorfismos da região promotora do gene RAGE com a enzima *Tsp509I* para restrição da região promotora de RAGE

Para a determinação do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE, o produto de PCR, contendo essa região, foi submetido à digestão pela enzima de restrição *Tsp509I* (New England Biolabs), conforme descrito na Tabela 3. Para o polimorfismo -374T>A, não foram analisadas as amostras que apresentaram a 63 Del, porque estes polimorfismos ocorrem na mesma região do DNA.

TABELA 3 - CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA *Tsp509I*.

REAGENTES	Volume (µL)	Concentração na reação
Produto de PCR	1,25	~12 ng
NEBuffer 1 [10X]	0,5	1X
<i>Tsp 509 I</i> [10 U/µL]	0,125	1,25 U
Água Reagente Tipo 1 estéril	3,125	---
Volume final	5	----

Homogeneizar e deixar em banho-maria a 65°C por 16 horas.

Tampão NEBuffer 1 [10X]: 100 mM Bis-Tris propano-HCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM ditiotretitol, pH 7,0 a 25°C.

4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos da região promotora do gene RAGE com a enzima *Alu* I para restrição da região promotora de RAGE

Para a determinação dos genótipos do polimorfismo -429T>C da região promotora, o produto de PCR dessa região foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Alu* I (Invitrogen), conforme descrito na Tabela 4 (promotor).

TABELA 4 - CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA *Alu* I.

REAGENTES	Volume (μ L)	Concentração no ensaio
Produto de PCR	1,25	~12 ng
Tampão React 1 [10X]	0,5	1X
<i>Alu</i> I [10 U/ μ L]	0,125	1,25 U
Água Reagente Tipo 1 estéril	3,125	
Volume final	5	---
Homogeneizar e incubar a 37°C por 16 horas		

Tampão NEBuffer 1 [10X]: 100 mM Bis-Tris propano-HCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM ditiotreitól, pH 7,0 a 25°C.

4.3.3 Identificação dos tamanhos dos fragmentos de restrição

Os produtos de restrição foram analisados utilizando eletroforese em gel de poliácridamida 29:1 (10%) em tampão TBE 1X (Sistema Rubi, Amersham). As eletroforeses foram realizadas com 5 μ L (~12ng) do produto de restrição misturados a 3 μ L de solução corante (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%), em tampão de corrida TBE 1X, 150V, 35 mA e 5W, por aproximadamente 4 horas à temperatura de 6 – 8 °C. Após a corrida eletroforética o DNA foi corado em brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizado sob luz ultravioleta (302nm). As imagens foram capturadas Sistema Biochemi (UVP).

4.4 QUANTIFICAÇÕES DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.

As determinações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, triglicérides e glicemia foram realizadas em sistema automatizado (Vitros 950) de química seca

(Johnson & Johnson) utilizando reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante do equipamento. As determinações foram realizadas no laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba.

A determinação de Hemoglobina glicada (HbA_{1c}) foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando coluna de troca iônica em sistema automatizado D-10 (Bio Rad, Bio-Oxford). As determinações foram realizadas no laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba.

A determinação dos AGEs fluorescentes foram realizadas como descrito por ZILIN et al 2001. Resumidamente, as amostras de soro foram diluídas 1:51 (60 µL soro + 3,0 mL diluente) com PBS (tampão fosfato salina, pH 7,4). O espectrofluorímetro (Spectrofluorophotometer, RF 5301 PC, Shimadzu) foi ajustado nos comprimentos de onda de 350 nm (excitação) e 440 nm (emissão) com abertura de fenda de 5 nm. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente (20 – 25°C) em cubeta de 1 cm de caminho ótico. Os resultados foram obtidos em intensidade de fluorescência relativa expresso em unidade arbitrária (UA) corrigida pela diluição. Para facilitar a leitura os resultados são apresentados como UA x 10³.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foi utilizado o teste “t” para amostras não pareadas. Variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal (triglicérides e AGEs fluorescentes) foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney.

Para as comparações entre variáveis não contínuas foram utilizadas os testes de Chi-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fischer bidirecional (RxC, MILLER, 1997).

As análises foram processadas utilizando o software Statistica para Windows versão 5.5 (StatSoft, 2001).

As frequências genotípicas e alélicas observadas para todos os polimorfismos investigados foram comparadas com as frequências esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, através do software disponível no seguinte endereço eletrônico

Para todas as análises, foi considerada significativa probabilidade $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram estudados 98 pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) todos em tratamento com insulino-terapia. Os dados antropométricos da amostra encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5- DADOS ANTROPOMÉTRICOS DA AMOSTRA EM ESTUDO

Parâmetro	Características
Sexo	Homens: 37 (37,8%) Mulheres: 61 (62,2%)
Idade (anos)	Média (\pm DP): 24,3 \pm 6,96 Mediana: 23,0 Amplitude de variação: 11 - 44
Etnia	Euro-Brasileiros: 70 (71,4%) Afro-Brasileiros: 28 (28,6%)
IMC (kg/m ²)	Média (\pm DP): 23,1 \pm 3,32 Mediana: 23,0 Amplitude de variação: 12,8 - 33,7
RCQ	Média (\pm DP): 0,80 \pm 0,07 Mediana: 0,81 Amplitude de variação: 0,66 - 1,0

IMC: Índice de massa corpórea, RCQ: razão cintura-quadril; DP: desvio padrão

Os valores dos parâmetros bioquímicos marcadores de risco para a doença cardiovascular (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides), controle glicêmico (hemoglobina glicada A1C) e AGEs fluorescentes, para a amostra em estudo encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6. VALORES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA A AMOSTRA EM ESTUDO

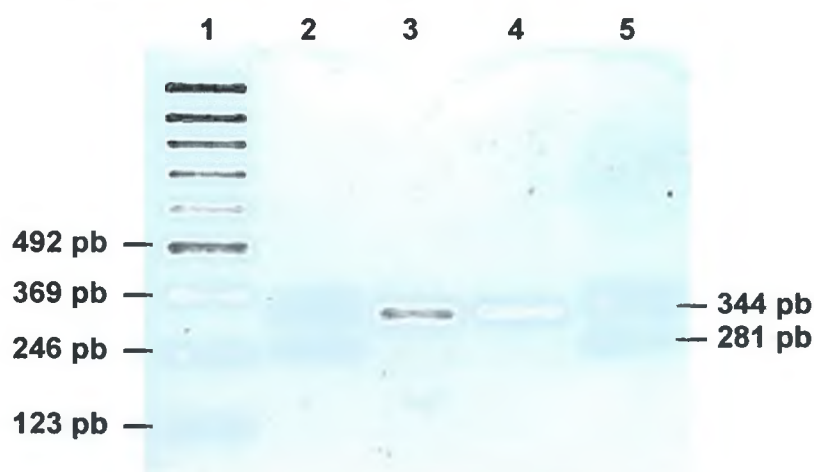
Parâmetros	Média	DP	Mediana	AV
Glicemia (mg/dL)	218,7	114,6	201,0	43-496
HbA _{1c} (%)	10,0	2,36	9,6	5,1-17,9
Colesterol total (mg/dL)	186,8	45,4	179,0	100-340
HDL-C (mg/dL)	50,1	9,8	48,0	32-77
LDL-C (mg/dL)	117,1	38,5	111,4	50-251
Triglicérides (mg/dL)	98,2	53,9	81,5	39-290
F-AGEs (UA x10 ³)	102,9	48,9	89,7	47,7-422,9

AV: amplitude de variação

5.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE

A Figura 7 mostra eletroforeograma em gel de agarose 1,5% típico dos produtos de amplificação com tamanho de 344 bp do fragmento contendo o promotor.

FIGURA 7. PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE.

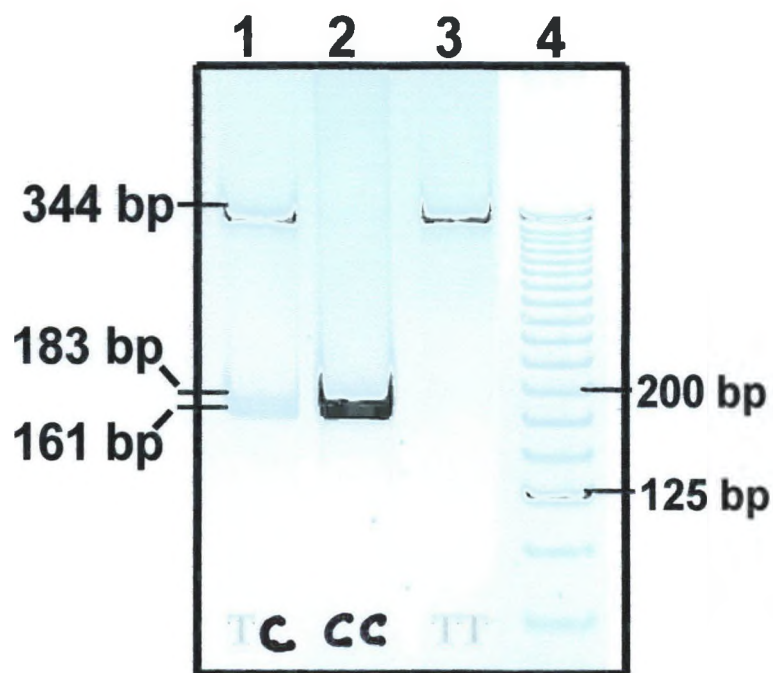


Eletroforese em gel de agarose 1,5 %, em tampão TBE 1X, 60V, 36 mA. O DNA foi corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizado sob luz ultravioleta (302nm). Imagem capturada pelo sistema de captação digital CCD Biochemi (UVP). Na linha 1 o marcador de massa molecular de 123 pb (Gibco). As linhas 3 e 4 mostram o perfil eletroforético do produto de PCR. As linhas 2 e 5 mostram amostras com a deleção de 63pb. A direita do gel estão mostrados os tamanhos esperados para os fragmentos amplificados e a esquerda os tamanhos do marcador de massa molecular.

5.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO POLIMORFISMO -429T>C

A Figura 8 mostra o perfil eletroforético dos após reação de PCR-RFLP e digestão do amplicom da região promotorar com a enzima *AluI*. A resolução das bandas permitiu evidenciar e diferenciar satisfatoriamente o padrão de bandas dos fragmentos digeridos.

FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP PARA O POLIMORFISMO -429T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.

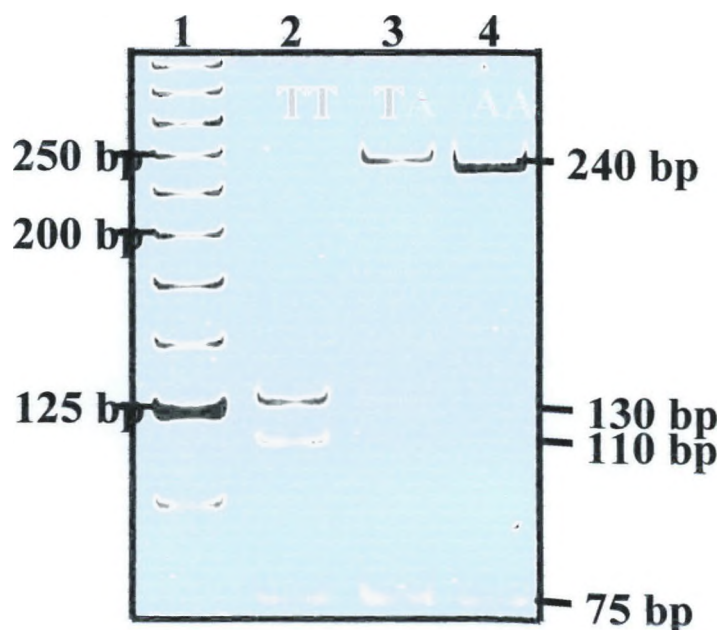


Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (29:1) com tampão TBE 1X, corada com brometo de etídeo e visualizada sob luz ultra-violeta (302 nm). Imagem capturada pelo Sistema Biochemi (UVP). Linhas 1, 2 e 3: genótipos TC, CC e TT, respectivamente; Linha 4: marcador de massa molecular de 25 bp.

5.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO POLIMORFISMO -374T>A

A Figura 9 mostra o perfil eletroforético dos genótipos após reação de PCR-RFLP e digestão do amplicom da região promotora com a enzima *Tsp509I*. A resolução das bandas permitiu evidenciar e diferenciar satisfatoriamente o padrão de bandas dos fragmentos digeridos.

FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP PARA O POLIMORFISMO -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE



Eletroforese em gel de poliácridamida 10% (29:1) com tampão TBE 1X, corada com brometo de etideo e visualizada sob luz ultra-violeta (302 nm). Imagem capturada pelo Sistema Biochemi (UVP). Linha 1: marcador de massa molecular de 25 bp ; Linhas 2, 3 e 4: genótipos TT, TA e AA, respectivamente.

5.5 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE COM MARCADORES DE RISCO PARA DAC

A comparação foi realizada comparando-se o genótipo usual contra o genótipo raro somado ao heterozigoto, devido a baixa freqüência do homozigoto raro. Para o polimorfismos -429T>C as comparações foram TT *versus* TC+CC e para o polimorfismos -374T>A foram TT *versus* TA+AA. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E MARCADORES DE RISCO PARA DAC, CONTROLE GLICÊMICO E AGES FLUORESCENTES PARA OS POLIMORFISMOS -429T>C E -374T>A DO GENE RAGE.

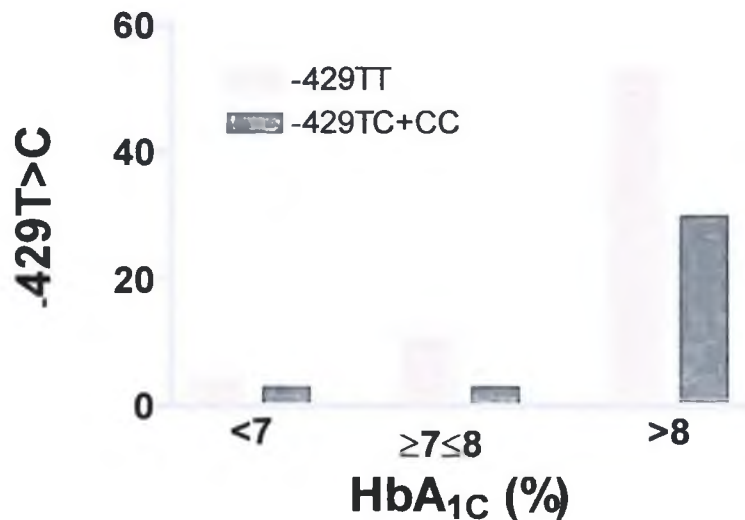
Polimorfismos (n=98)	-429T>C		P	-374T>A		P
	TT (n=66)	TC+CC (n=32)		TT (n=43)	TA+AA (n=55)	
HbA1C (%)	9,8±2,2	10,4±2,7	0,383	10,1±2,6	9,9±2,2	0,675
Colesterol (mg/dL)	186,4±44,9	191,0±48,0	0,878	193,0±48,8	184,1±43,3	0,336
HDL-C (mg/dL)	49,8±9,5	51,5±10,1	0,576	51,3±10,6	49,6±8,8	0,381
LDL-C (mg/dL)	116,5±37,9	120,4±41,3	0,827	121,8±42,5	114,6±35,9	0,361
Triglicérides (mg/dL)	100,8±54,2	95,4±52,0	0,601†	99,1±47,8	99,0±57,6	0,593†
F-AGEs (UA x10 ³)	98,5±30,2	113,1±74,9	0,997†	113,7±66,3	95,1±28,4	0,131†

† teste U de Mann-Whitney. Demais comparações pelo teste "t"

5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429T>C E A CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HbA_{1c})

As frequências dos genótipos TT e TC+CC do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE foram comparadas com concentrações de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) que estão associadas ao controle glicêmico. Concentrações de HbA_{1c} <7% indicam controle adequado, entre 7 e 8% controle apenas satisfatório e acima de 8% controle inadequado da glicemia. Quando as distribuições observada foram analisadas pelo teste do chi-quadrado não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos e o controle glicêmico (χ^2 , P=0,359).

FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO -429T>C E CONCENTRAÇÕES DE HbA_{1c}

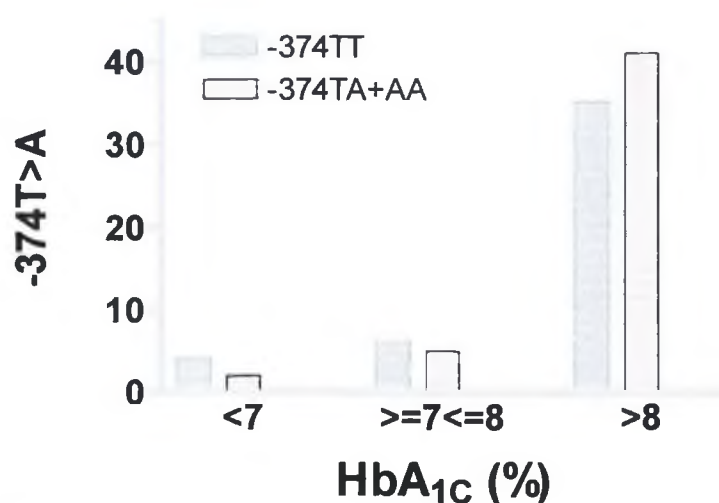


Frequências genotípicas em porcentagem (%)

5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -374T>A E A CONCENTRAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA (HbA_{1c})

As frequências dos genótipos TT e TA+AA do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE foram comparadas com concentrações de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) que estão associadas ao controle glicêmico. Concentrações de HbA_{1c} <7% indicam controle adequado, entre 7 e 8% controle apenas satisfatório e acima de 8% controle inadequado da glicemia. Quando as distribuições observada foram analisadas pelo teste do chi-quadrado não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos e o controle glicêmico ($\chi^2=0,75$).

FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO -374T>A E CONCENTRAÇÕES DE HbA_{1c}



Frequências genotípicas em porcentagem (%)

6. DISCUSSÃO

As alterações metabólicas geradas pelo estado de hiperglicemia crônica, comum ao paciente diabético, duplicam o risco para a doença arterial coronariana (DAC). O estado hiperglicêmico também aumenta a concentração de produtos finais de glicação avançada (AGEs) o que definitivamente contribui para acelerar as complicações associadas ao diabetes como microangiopatia, nefropatia e retinopatia.

A interação dos AGEs com o receptor RAGE desencadeia respostas celulares que favorecem aos processos de trombogênese, aterogênese e a resposta inflamatória. Também está documentado que polimorfismos do gene RAGE como os estudados neste trabalho aumentam a expressão da proteína RAGE.

Em pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Fixação de Nitrogênio da UFPR, foi demonstrado que o alelo -429C está associado com o diabetes tipo 1 (PICHETH et al., 2007a) e que o alelo -374A oferece proteção em relação à severidade da doença cardiovascular em pacientes com diabetes tipo 2 (PICHETH et al., 2007b). Entre as hipóteses propostas que associam os polimorfismos de RAGE com diabetes e DAC, foi sugerido que a proteína RAGE poderia estar interferindo indiretamente com as concentrações séricas de parâmetros bioquímicos que são marcadores de risco para DAC, como os componentes do perfil lipídico ou mesmo afetando o controle glicêmico, monitorado pela hemoglobina glicada.

Estes elementos em conjunto compõe o racional desta pesquisa que objetiva associar os polimorfismos da região promotora de RAGE -429T>C e -374T>A com as concentrações séricas de marcadores de risco para a DAC, a concentração de hemoglobina glicada (HbA_{1C}) um marcador do controle glicêmico e a concentração sérica de AGEs fluorescentes em pacientes com diabetes tipo 1.

6.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

A amostra de 98 pacientes estudados, oriundos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, mostra predominância de mulheres (62,2%) e de etnia Euro-Brasileira (71,4%) possivelmente refletindo as características dos pacientes do HC da UFPR (Tabela 5). A idade média de $24 \pm 6,9$ anos (11-44) é compatível com outros estudos que abordam diabéticos tipo 1, uma patologia de manifestação em idade precoce, abaixo de 40 anos (American Diabetes Association 2007). Também os valores baixos do índice de massa corpora ($23,1 \pm 3,3$ kg/m²) e da razão cintura/quadril ($0,80 \pm 0,07$) são compatíveis com pacientes diabéticos tipo 1 aonde a redução ponderal é fator característico associado ao processo patológico (Tabela 5).

Quanto aos parâmetros laboratoriais (Tabela 6), a amostra em estudo esta caracterizada por paciente com controle precário da glicemia, demonstrado por valores médios da glicose sérica ($218,7 \pm 114,6$ mg/dL) e HbA_{1c} ($10,0 \pm 2,36$ %). Uma justificativa plausível para este achado seriam as condições socioeconômicas da população que busca os serviços do Hospital de Clínicas da UFPR aonde a baixa renda familiar dificulta o acesso ao tratamento adequado, recordando que diabéticos tipo 1 necessitam obrigatoriamente do uso de insulina exógena.

Os valores médios do perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides) não diferiram significativamente quando comparado com os valores desejáveis para a faixa etária da amostra (colesterol < 200 mg/dL; HDL-C >45 mg/dL; LDL-C < 130 mg/dL e TG < 150 mg/dL) segundo o Consenso Brasileiro para Dislipidemias (IV Diretriz Brasileira em Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose, 2007). É possível inferir dos valores do perfil lipídico que, na média, estes pacientes ainda não manifestam risco significativo para a doença arterial coronariana (Tabela 6).

Os valores dos AGEs fluorescentes (Tabela 6) observados nos pacientes em estudo ($102,9 \pm 48,9$ UA $\times 10^3$) são significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados a um grupo não diabético ($55,3 \pm 13,1$) (PICHETH, 2007). Este dado é esperado uma vez que a hiperglicemia crônica associada ao diabetes e o controle

glicêmico precário (elevada HbA_{1c}) observado na amostra em estudo favorecem a glicação não-enzimática (formação dos AGEs).

6.2 PCR-RFLP DA REGIÃO PROMOTORA DE RAGE

O procedimento da reação em cadeia da polimerase empregado para amplificar um fragmento de 344 pb a região promotora de RAGE (-590 a -246) foi realizado com eficácia e sem produtos inespecíficos, como observado na Figura 7. Nesta figura também são mostrados o perfil eletroforético de duas amostras que contemplam a deleção de 63pb (-407 a -345) em heterozigose, que foram excluídas das análises, pela baixa frequência e afetarem o sítio do polimorfismos -374T>A.

O perfil eletroforético para as reações de PCR-RFLP (Figuras 8 e 9) mostram que o procedimento empregado permitiu genotipar de forma inequívoca todas as amostras. A utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida, embora mais trabalhoso quando comparado à agarose mostrou-se superior na identificação dos genótipos, sendo portanto recomendado para futuras investigações.

6.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS E MARCADORES BIOQUÍMICOS.

As frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo -429T>C não diferem entre Euro- e Afro-Brasileiros (alelo C: 12,9% versus 12,1%) como relatado para uma população saudável por TORRES (2006). A referida autora encontrou diferença significativa entre as frequências alélicas e genotípica para o polimorfismo -374T>A em uma população saudável com predomínio do alelo A em Euro-Brasileiros comparados a Afro-Brasileiros (alelo A: 34,7% versus 23,1%, respectivamente, $p=0,041$).

HEIDEMANN (2005) estudando a mesma amostra de diabéticos tipo 1, que pertencem a este trabalho não observou diferença significativa entre Euro- e Afro-Brasileiros quanto ao polimorfismo -374T>A (alelo A: 35,6% versus 24,1%, respectivamente, $p=0,11$). Embora as frequências alélicas descritas por Heidemann sejam muito semelhantes àquelas relatadas por Torres para este polimorfismo as divergências quando a significância podem ser atribuídas, possivelmente ao tamanho amostral. Torres estudou um tamanho amostral semelhante de Euro- e

Afro-Brasileiros (~65 indivíduos em cada grupo), enquanto os grupos de Heidemann foram díspares (73 Euro- e 29 Afro-Brasileiros).

A concentração média da HbA_{1c}, um marcador para o controle glicêmico, não diferiu entre os portadores do genótipo comum em homozigose (T/T) quando comparado ao genótipo raro somado ao heterozigoto para os polimorfismos -429T>C e -374T>A, como mostrado na Tabela 7. Portanto, os polimorfismos de RAGE em estudo não apresentaram associação com a concentração sérica média de glicose em pacientes com diabetes tipo 1. Nossos resultados são diferentes daqueles publicados por LAKI et al (2007) que mostraram que diabéticos tipo 1 portadores dos genótipos -429TC+CC apresentam concentrações de HbA_{1c} maiores que aqueles com genótipo -429TT. Possíveis explicações para esta divergência podem ser atribuídas aos diferentes tamanhos amostrais e as diferentes características das populações estudadas.

Vários estudos tem apontado a presença do alelo -374A em homozigose como um fator associado à proteção quanto ao risco para a doença arterial coronariana e para as complicações associadas ao diabetes 2 (FALCONE et al 2005; SANTOS et al 2005; PICHETH et al 2007). O Alelo -374A em homozigose também foi associado à menor frequência de doença cardiovascular em diabéticos tipo 1 Finlandeses (PETTERSSON-FERNHOLM et al 2003). Os analitos que compõem o perfil lipídico não apresentaram associação com os polimorfismos em estudo neste trabalho (Tabela 7). Diferenças nas características étnicas e na seleção dos pacientes podem explicar os resultados díspares com os outros estudos anteriormente citados. Também o tamanho amostral do presente estudo, relativamente pequeno, deve ser considerado como possível fator que afeta a comparação com outros estudos.

As concentrações séricas de AGEs fluorescentes não foram associadas com os genótipos dos polimorfismos em estudo (Tabela 7). Como a concentração de AGEs sérico esta relacionada ao controle glicêmico era possível que apresentasse associação com polimorfismos que afetam a expressão de RAGE, um receptor celular para estas moléculas. KILHOVD e colaboradores (2003) observaram que a concentração de AGEs séricos foi maior em diabéticos tipo 2 com doença cardiovascular quando comparada a um grupo controle. Neste estudo podem ter afetado o resultado o já mencionado tamanho amostral, mas principalmente a

elevada variação na medida fluorométrica dos AGEs, observada pelo desvio padrão, para ambos polimorfismos.

PETTERSSON-FERNHOLM *et al* 2003 demonstraram que o polimorfismo -374T>A estava associado a diabéticos tipo 1 com controle inadequado da glicemia caracterizado por HbA_{1C} > 9,5%. Para verificar se o mesmo efeito poderia ser observado na amostra em estudo, a amostra foi subclassificada de acordo com a concentração da HbA_{1C} em <7% (controle glicêmico adequado), ≥7 e ≤8% (controle glicêmico aceitável) e >8% (controle glicêmico inadequado). Os resultados para os polimorfismos -429T>C e -374T>A são mostrados, respectivamente, nas Figuras 9 e 10. Para os polimorfismos analisados não foi observada associação significativa (χ^2 , $p>0,05$) entre o controle glicêmico, estimado pela concentração da HbA_{1C}, e os genótipos em estudo. Diferenças étnicas entre as populações podem explicar os resultados discordantes entre este trabalho e o de PETTERSSON-FERNHOLM *et al* 2003.

Em síntese, este trabalho não mostrou associação entre os marcadores de risco para DAC e o controle da glicemia com os polimorfismos -429T>C e -374T>A da região promotora do gene RAGE. Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento dos efeitos do gene RAGE no diabetes tipo 1.

7. CONCLUSÕES

- Não foram observadas associações entre os polimorfismos estudados em diabéticos tipo 1 com
 - ◇ o perfil lipídico (colesterol total, HDL-C; LDL-C e triglicérides)
 - ◇ a concentração sérica de AGEs fluorescentes (F-AGEs)
 - ◇ e com o controle glicêmico monitorado pela concentração da Hemoglobina glicada HbA_{1c}

REFERÊNCIAS

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras Cardiol.** V. 88 (supp I), 2007

AHMED, M. U., THORPE, S. R. AND BAYNES, J. W., **J. Biol. Chem.**, 261, 4889–4894, 1986.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care** 28:suplemento 1, janeiro,2005

ARAKI, N.; et al., **Eur. J. Biochem.**, 230, p. 408–415, 1995.

AUSTIN, M.A.; HOKANSON, J.E.; EDWARDS, K.L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. **Am. J. Cardiol.**, 81:7 – 12B, 1998.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. **Free Radical Biol. Med.**, v. 28, p. 1708-1716, 2000.

BONNARDEL-PHU, E.; WAUTIER, J.L.; SCHMIDT, A.M.; AVILA, C.; VICAUT, E. Acute modulation of albumin microvascular leakage by advanced glycation end products in microcirculation of diabetic rats in vivo. **Diabetes**, 48(10):2052-8, 1999.

BOOTH, A.A.; KHALIFAH, R.G.; TODD, P.; HUDSON, B.G. In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. **J Biol Chem**, 272(9):5430-7, 1997.

BROWNLEE, M.M.D. Advanced Protein Glycosilation in Diabetes and Aging. **Annu. Rev. Med.**, 46: 223-234, 1995.

BROWNLEE, M.: Lilly Lecture 1993: Glycation and diabetic complications. **Diabetes** 43, p. 836–841, 1994.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Advanced glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetes complication. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, p. 1315 – 1321, 1988.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; KOONEY, T.; et al. Aminoguanidine prevents diabetes induced arterial wall protein cross-linking. **Science**, 232, p. 1629–32, 1986.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. **Diabetes**, 34, p. 938–41, 1985.

BROWNLEE, M.; PONGOR, S.; CERAMI, A. Covalent attachment of soluble protein by nonenzymatically glycosylated collagen: role in the *in situ* formation of immune complexes. **J. Exp. Med.**, 158, p. 1739–44, 1983.

BRETT, J.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; ZOU, Y.S.; WEIDMAN, E.; PINSKY, D.; NOWYGRAD, R.; NEEPER, M.; PRZYSIECKI, C.; SHAW, A.; MIGHELI, A.; STERN, D. Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **Am. J. Pathol.** 143, p. 1699-1712, 1993.

BUCALA, R.; LEE, A.T.; ROURKE, L.; CERAMI, A. Transposition of an Alu-containing element induced by DNA-advanced glycosylation endproducts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:2666–70, 1993.

BUCALA, R.; MODEL, P.; CERAMI, A. Modification of DNA by reduced sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81: 105–9, 1984.

CHARONIS, A.S.; REGER, L.A.; DEGE, J.E.; et al. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. **Diabetes**, 39: 807–14, 1990.

COLLINS, T., **Lab. Invest.**, 68, p. 499–508, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLINS, T. Robins. Pathologic basis of disease. **Saunders**: Philadelphia, 1999.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: recent developments. **BMJ**, 328, 750-754, 2004.

DING, Q.; KELLER, J. N. Evaluation of RAGE isoforms, ligands, and signaling in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1746, p. 18-27, 2005.

DYER, D.; DUNN, J.; THORPE, S.; BAILIE, K.; LYONS, T.; MCCANCE, D.; BAYNES, J. **J. Clin. Invest.** 91, 2463-2469, 1993.

EBLE, A.S.; THORPE, S.R. e BAYNES, J.W. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p.9406 – 9412, 1983.

EL KHOURY, J.; THOMAS, C.A.; LOIKE, J.D.; HICKMAN, S.É.; CAO, L.; SILVERSTEIN, S.C. Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scavenger receptors. **J Biol Chem** 269: 10197–10200, 1994.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin versão 3.01 - An Integrated software package for population genetics data analysis**, 2006.

FALCONE, C.; CAMPO, I.; EMANUELE, E.; BUZZI, M. P.; GEROLDI, D.; BELVITO, C.; ZORZETTO, M.; SBARSI, I.; CUCCIA, M. –374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Clin. Chim. Acta**, 354, p. 111-116, 2005.

FALCONE, C.; CAMPO, I.; EMANUELE, E.; BUZZI, M.P.; ZORZETTO, M.; SBARSI, I.; CUCCIA, M. Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease, 2004.

FARMAR, J. G., ULRICH, P. C. AND CERAMI, A., *J. Org. Chem.*, 53, 2346–2349, 1988.

GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769).

HARDING, J.J. Nonenzymatic covalent posttranslational modification of proteins *in vivo*. *Adv. Protein. Chem.*, v. 37, p.248 – 334, 1985.

HEIDEMANN, M. Polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE em diabéticos tipo 1. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2005, 35p.

HOFMANN, M.A.; DRURY, S.; FU, C.; QU, W.; TAGUCHI, A.; LU, Y.; AVILA, C.; KAMBHAM, N.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; NEURATH, M.F.; SLATTERY, T.; BEACH, D.; MCCLARY, J.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; STERN, D.; SCHMIDT, A.M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97(7):889-901, 1999.

HUDSON, B.I.; HOLFMAN, A.M.; BUCCIARELLI, L.; WENDT, T.; MOSER, B.; LU Y.; QU, W.; STERN, D.M.; D'AGATTI, V.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; GRANT, P.J.; SCHMIDT, A.M. Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Diabetes*, v. 83, n. 12, 2002.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; FUTERS, T.S.; GRANT, P.J. Effects of novel polymorphisms in the AGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*, 50, p. 1505–1511, 2001.

HUDSON, B.I.; STICKLAND, M.H.; GRANT, P.J. Identification of polymorphisms in the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene. *Diabetes*, v. 47, n. 7, 1998.

HUTTUNEN, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Tese*. University of Helsinki, p.42, 1996.

ICHIKAWA, K. et al., *Atherosclerosis*, p. 281–287, 1998.

JACOBY, R.M.; NESTO, R.W. Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis. *J Am Coll Cardiol*, 3, 736-44, 1992.

JIXIONG, X.; BILIN, X.; MINGGONG, Y.; SHUQIN, L. -429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26(9):2696-7, 2003.

KIRBIS, J.; MILUTINOVIĆ, A.; STEBLOVNIK, K.; TERAN, N.; TERZIĆ, R.; ZORC, M. The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. **Coll Antropol**, 28(2):611-6, 2004.

JONO, T.; MIYAZAKI, A.; NAGAI, R.; SAWAMURA, T.; KITAMURA, T.; HORIUCHI, S., **FEBS Lett.**, 511, p. 170–174, 2002.

KANNEL, W.B.; MCGEE, D.L., Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. **Circulation**, 59, p. 8-13, 1979.

KANKOVÁ, K.; STEJSKALOVÁ, A.; HERTLOVÁ, M.; ZNOJIL, V. Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. **Nephrol Dial Transplant**, 20: 1093–1102, 2005.

KANKOVÁ, K.; MAROVA, I.; ZAHEJSKY, J.; et al. Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status. **Metabolism**, 50, p. 1152–1160, 2001.

KANKOVÁ, K.; VASKU, A.; HAJEK, D.; ZAHEJSKÝ, J.; VASKU, V. Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complications in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1745, 1999.

KEEN, H. CLARK, C. LAAKSO, M.; Reducing the burden of diabetes: managing cardiovascular disease. **Diabetes Metab Res Rev**, 3, 186-96, 1999.

KENT, M.J.C.; LIGHT, N.D.; BAILEY, A.J. Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation *in vitro*. **Biochem. J.**, 225, p. 745–52, 1985.

KILHOVD, B.K.; GIARDINO, I.; TORJESSEN, P.A.; BIRKELAND, K.I.; BERG, T.J.; THORNALLEY, P.J. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. **Metabolism**, v.52, p.163-167, 2003.

KING, G.; BROWNLEE, M. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.** 25, p. 255-270, 1996.

KUMARAMANICKAVEL, G.; RAMPRASAD, V.L.; SPRIPRIYA, S.; et al. Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. **J Diabetes Complications**, 16, 391- 4, 2002.

KUNIYASU, A.; OHGAMI, N.; HAYASHI, S.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S.; NAKAYAMA, H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. **FEBS Letters**, 537, p. 85-90, 2003.

LAKI, J., KISZEL, P.; VATAY, A.; BLASKÓ, B. MARGIT KOVÁCS, M. ANNA KÖRNER, A., MADÁCSY, L.;BLATNICZKY, L.; ALMÁSSY, Z.; SZALAI, C.; RAJCZY, K.; POZSONYI, E.; KARÁDI, I.;FAZAKAS, A.; HOSSZÚFALUSI, N.; PÁNCZÉL, P.; ARASON, G.J.; WU, Y.-L.; ZHOU, B.; YANG, Y.; YU, C.-Y.; FÜST, G. The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429T >C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobinA1C levels in diabetic patients. **Mol. Immunol.**, v. 44, p.648–655, 2007.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.I. Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for FRLP studies. **Nucleic Acid Research**; 19:5444, 1991.

LAPOLLA, A; TRALDI, P; FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clin. Biochem.**, 38: 103-115, 2005.

LI, Y. M. et al., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, p. 11047–11052, 1996.

LINDHOLM, E.; BAKHADZE, E.; SJÖGREN, M.; CILIO, C.M.; AGARDH, E.; GROOP, L.; AGARDH, C.-D. The -374T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetes patients. **Diabetologia**, v.49, p.2745-2755, 2006.

LIU, L.; XIANG, K. RAGE Gly82Ser polymorphism diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, v. 22, número 4, p. 616, 1999.

MATSUNAGA-IRIE, S.; MARUYAMA, T.; YAMAMOTO, Y.; et al. Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, 27, p. 303–307, 2004.

MCPHERSON JD, SHELTON BH, WALTON DJ. Role of fructose in glycation and crosslinking of proteins. **Biochemistry** 27: 1901–7, 1988.

MILLER, M.P. **RxC: a program for the analysis of contingency tables via the metropolis algorithm computer**. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.

MIYATA, T.; MAEDA, K.; KUROKAWA, K.; YPERSELE-STRIHOU, C. Oxidation conspires with glycation to generate noxious advanced glycation end products in renal failure. **Nephrol. Dial. Transplant.**, 12: 233 – 258, 1997.

NAKA, C.L.; PICHETH, G.; ALCÂNTARA, V.M.; RÉA, R.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; MARTINEZ, T.L.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The Gly82Ser Polymorphism of the Receptor of Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene is not associated with type 1 or type 2 diabetes in a Brazilian population. **Diabetes Care**, volume 29, 712 – 713, 2006.

NAGARAJ, R.H.; SHIPANOVA, I.N.; FAUST, F.M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. **J. Biol. Chem.**, 271: 19338 – 19345, 1996.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A.M.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WANG, F.; PAN, Y.C.; ELLISTON, K.; STERN, D.; SHAW, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem** 267: 14998–15004, 1992.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney Int.**, 58 (Suppl 77): S26-30, 2000.

NJORGE, F.G., SAYRE, L.M. AND MONNIER, V.M., Detection of D -glucose-derived pyrrole compounds during maillard reaction under physiological conditions. **Carbohydr. Res**, 167, 211–220, 1987.

O'BRIEN, K.D. et al., Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. **c**, 92, p. 945–951, 1993.

OHGAMI, N. et al., CD36, a Member of the Class B Scavenger Receptor Family, as a Receptor for Advanced Glycation End Products **J Biol Chem**, 276, p. 3195–3202, 2001.

PETTERSSON-FERNHOLM, K.; FORSBLOM, C.; HUDSON, B.I.; PEROLOA, M.; GRANT, P.J.; GROOP, P.H. The functional –374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, 52, p. 891-894, 2003.

PICHETH, G. Associação de polimorfismos do gene do receptor de AGEs (RAGE) com fatores de risco para a doença coronariana em indivíduos com e sem *Diabetes mellitus*. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímicas da Universidade Federal do Paraná. 2007, 112p.

PICHETH, G.; HEIDEMANN, M.; PEDROSA, F.O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; COSTANTINI, C.O.; MARTINEZ, T.L.R.; SOUZA, E.M. The -429 T>C Polymorphism of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) is Associated with Type 1 Diabetes in a Brazilian Population. **Clin Chim Acta**, v.1, p.163-164, 2007a.

PICHETH, G.; COSTANTINI, C.O.; PEDROSA, F.O. MARTINEZ, T.L.R.; SOUZA, E.M. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. **Clin Chem Lab Med**, v.45,1268-1272 , 2007b.

POIRIER, O.; NICAUD, V.; VIONNET, N.; et al. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes**, 50, 1214-8, 2001.

PONGOR, S.; ULRICH, P.; BENCSATH, A.; CERAMI, A. Aging of Proteins: Isolation and Identification of a Fluorescent Chromophore from the Reaction of Polypeptides with Glucose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81, 2684–2688, 1984.

QUEHENBERGER, P.; GRETEN, J.; RIEDESEL, J.V.; ZIEGLER, R.; WAHL, P.; SPEISER, W.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.P., **Thrombosis Haemostasis**, 73, p. 917, 1995.

RITTHALER, F.; DENG, Y.; ZHANG, Y.; GRETEN, J.; ABEL, M.; SIDO, B.; ALLENBERG, J.; OTTO, G.; ROTH, H.; BIERHAUS, A.; ZIEGLER, B.; SCHMIDT, A.M.; WALDBERR, R.; WAHL, P.; STERN, D.M.; NAWROTH, P.P. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. **Am. J. Pathol.**, 146, p. 688-694, 1995.

RUDOFISKY, G. Jr.; ISERMANN, B.; SCHERKOFER, S.; ANDRASSY, M.; SCHNEIDER, J.G.; MORCOS, M.; HUMPERT, P.M.; SAYED, A.A.; WITTE, S.; RENN, W.; HAMANN, A.; NOSIKO, V.; SCHLEICHER, E.; HARING, H.U.; RUDOFISKY, G.; RITZ, E.; NAWROTH, P.P.; BIERHAUS, A. A 63 bp deletion in the promoter of RAGE correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, 112(3):135-41, 2004.

SACKS, B.D.; BRUNS, D.E.; GOLDSTEIN, D.E.; MACLAREN, N.K.; McDONALD, J.M.; PARROTT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin. Chem.**, v.48, p. 436 – 472, 2002.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. Molecular cloning - a laboratory manual. 2^{ed.}, **Cold spring Harbor Laboratory Press**, Plainview, 1989.

SANTOS KG, CANANI LH, GROSS JL, TSCHIEDEL B, SOUTO KEP, ROISENBERG I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. **Mol. Genet. Metab.**; v.85, p.149-156, 2005.

SCHENK, S.; SCHRAML, P.; BENDIK, I.; LUDWIG, C.U. A novel polymorphism in the promoter of the RAGE gene is associated with non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 32, p.7-12, 2001.

SCHMIDT, A.M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WAUTIER, J.L.; STERN, D.; Cellular receptors for advanced glycation end products. **Arterioscler. Thromb.**, 14, p. 1521–1528, 1994.

SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; WAUTIER, J.L.; STERN, D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circ Res**, 84(5):489-97, 1999.

SCHMIDT, A.M.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; STERN, D.M. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1498, p. 99-111, 2000.

- SCHMIDT, A.M.; STERN, D.M. RAGE: A new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **TEM**, v. 11, p.368-375, 2000.
- SELKOE, D.J. A central role for amyloid. **J. Neuropathol., Exp. Neurol.** 53, 438-447, 1994.
- SELL, D.R.; MONNIER, V.M., Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. **J. Biol. Chem.**, 264, 21597–21602, 1989.
- SHASTRY, B.S. SNP alleles in human disease and evolution. **J Hum Genet**, 47(11):561-6, 2002.
- SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, 44: 129-146, 2001.
- SUGAYA, K.; FUKAGAWA, T.; MATSUMOTO, K.I.; MITA, K.; TAKAHASHI, E.O.I.; ANDO, A.; INOKO, H.; IKEMURA, T. Three genes in the human MHC class III region near junction with the class II: gene for receptor for advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a Notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics**, v. 23, p. 408 – 419, 1994.
- SULLIVAN, C.M.; FUTERS, T.S.; BARRETT, J.H.; HUDSON, B.I. ; FREEMAN, M.S. ; GRANT, P.J. RAGE polymorphisms and the heritability of insulin resistance: the Leeds family study. **Diab Vasc Dis Res**, (1):42-4, 2005.
- SUZUKI, H. et al., A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. **Nature**, 386, p. 292–296, 1997.
- TORRES, M.C. Polimorfismo da região promotora e do exon 3 do gene RAGE (Receptor de Produtos de Glicação Avançada) em uma amostra da população Brasileira. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. 2006, 53p.
- TSILBARY, E.C.; CHARONIS, A.S.; REGER, L.A.; et al. The effect of nonenzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. **J. Biol. Chem.**, 263, p. 4302–8, 1988.
- VASKÚ, V.; KANKOVÁ, K.; VASKÚ, A.; MUZIK, J.; IZAKOVICOVÁ HOLLÁ, L.; SEMRADOVÁ, V.; VÁCHA, J. Gene polymorphisms (G82S, 1704 G/T, 2184 A/G and 2245 G/A) of the receptor of advanced glycation end products (RAGE) in plaque psoriasis. **Areli. Dermatol. Res.**, 294, p. 127-130, 2002.
- VIGNESHWARAN, N.; BIJUKUMAR, G.; KARMAKAR, N.; ANAND, S.; MISRA, A.; Autofluorescence characterization of advanced glycation end products of hemoglobin. ., 61 (1-2):163-70, 2005.

VLASSARA, H.; LI, Y. M.; IMANI, F.; WOJCIECHOWICZ, D.; YANG, Z. e CERAMI, A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. **Mol. Med.**, v. 1, p.634 – 646, 1995.

VLASSARA, H.; BUCALA, R. e STRIKER, L. Pathogenic effects of advanced glycosilation: biochemical, biologic and clinical implication for diabetes and aging. **Lab. Invest.**, v. 70, p.138 – 151, 1994.

VLASSARA, H., BROWNLEE, M.; CERAMI, A. Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. **J. Exp. Med.**, v. 164, p. 1301 – 1309, 1986.

VLASSARA, H., BROWNLEE, M.; CERAMI, A. High-affinity receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p.5588 – 5592, 1985.

WESTWOOD, M.E.; THORNALLEY, P.J., J. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. **Protein Chem.**, 14, p. 359–372, 1995.

YAMAGISHI, S.; FUJIMORI, H.; YONEKURA, H.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. **Diabetol.**, v.41, p.1435-1441, 1998.

YAMAGISHI, S. et al. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: A possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,213, p. 681–687, 1995.

YANG, Z.; MAKITA, Z.; HORII, Y.; BRUNELLE, S.; CERAMI, A.; SCHAJPAL, P.; SUTHANTHIRAN, M. e VLASSARA, H. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosilation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 515 – 524, 1991.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; TAKAKURA, Y.; UMEKAWA, T.; KOGURE, A; TODA, H.; YOSHIKAWA, T. Association study of G1704T and G82S polymorphisms of RAGE gene for microalbuminúria in Japanese type 2 diabetic patients. **Metabol. Clin. Exper.**, v.54, p.488-491, 2005

ZILIN, S.; NAIFENG, L., BICHENG, L.; JIPING, W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin. Chim. Acta**, v. 313, p. 69-75, 2001.

ZOUKOURIAN, C.; WAUTIER, M.P.; CHAPPEY, O.; DOSQUET, C.; ROHBAN, T.; SCHMIDT, A.M.; STERN, D.; WAUTIER, J.L. Endothelial cell dysfunction secondary

to the adhesion of diabetic erythrocytes. Modulation by iloprost. **Int Angiol**,
15(3):195-200, 1996