

MICHELLE DA CUNHA TORRES



**POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA E DO EXON 3 DO GENE RAGE
(RECEPTOR DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA) EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

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 Geraldo Picheth

CURITIBA

2007

MICHELLE DA CUNHA TORRES

**POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA E DO EXON 3 DO GENE RAGE
(RECEPTOR DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA) EM UMA
POPULAÇÃO BRASILEIRA**

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 Geraldo Picheth

CURITIBA

2007

Aos pilares da minha vida: família, amigos e orientadores.

AGRADECIMENTOS

À minha incrível família que sempre fez o possível para me dar o bem mais precioso, uma educação de qualidade. Aos queridos irmãos mais velhos, Eduardo, Janaina e Patrícia, que são um grande exemplo a ser seguido, cuidaram de mim em todos os sentidos e são verdadeiros amigos; à minha mãe que sempre esteve comigo e zelou pelo meu crescimento; e ao meu “paitrocinador”, grande amigo, e maior modelo de sucesso que eu poderia ter, sempre dando aos filhos muito amor, o necessário e também o extraordinário. À minha madrasta, Márcia, por cuidar tão bem do meu pai e ser uma grande amiga.

A todos os professores especiais que passaram pela minha vida e deixaram uma marca especial na busca pelo conhecimento, e principalmente aos meus orientadores, Ciro e Marco da Biologia Celular, que me abriram as portas da Ciência; e aos meus atuais orientadores de pesquisa e de vida, que sempre escutam as minhas dúvidas de graduanda e me dão os melhores conselhos, Emanuel, pela grande oportunidade de trabalhar com o que eu realmente gosto, e Geraldo, pelos ensinamentos detalhados das práticas laboratoriais e dos caminhos da vida, e pela grande amizade. À Maria Luiza, professora que cedeu gentilmente as amostras usadas neste estudo, e sempre se mostrou muito prestativa para tirar as dúvidas do projeto.

A duas Márcia's: Heidemann, que sempre me ajuda com todo o material que pode pra me dar uma direção a seguir, pelas conversas, e pelas discussões esclarecedoras de teoria do nosso objeto de estudo; e Holsbach, pela ajuda com as amostras e estatísticas, sempre muito prestativa e que em poucas conversas já virou uma grande amiga. Também a todo o pessoal do laboratório, Ana C., Ju, Gus e Marcelo, e a todo o pessoal do Núcleo de Fixação Biológica do Nitrogênio, principalmente Roseli Prado e Valter, pelos eventuais, porém, imprescindíveis esclarecimentos de dúvidas no dia-a-dia do laboratório.

Aos amigos da praia e companheiros de esporte, Kassyo e Kayo, ao irmão mais novo e mais querido, Vítor, e à querida sobrinha, Thaminne, irmã que eu não tive porque me faz ver o verdadeiro sentido da irmandade e da amizade, sempre com muita diversão. Ao pessoal do vôlei, responsável pela minha ansiosa espera por toda quinta-feira, uma verdadeira terapia ao estresse acumulado na semana.

A três incríveis gurias, Juliana, companheira de congressos e amiga pras melhores risadas; à Sarah, mãezona, sempre preocupada com o meu sucesso, e parceira das diversões; e à Bruna, minha “roomie”, companheira de conversas e gargalhadas nas noites no apê e do vôlei.

Aos perfeitos amigos que viraram uma verdadeira família e fazem os meus dias muito mais sorridentes, Gilson, Rodrigo, Tiago e Ariane, a parceira de todos os trabalhos e estudos desde os primórdios da faculdade, e verdadeira amiga, de momentos bons e dos menos nobres também.

A André Gustavo, a pessoa mais especial que apareceu nos últimos tempos na minha vida; a melhor companhia pra tudo, paciente comigo nos momentos de estresse, o parceiro mais perfeito pra construir a minha história, um grande professor e responsável por eu me tornar uma pessoa muito melhor.

Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram pela minha vida e me fizeram ser quem eu sou, ou que simplesmente me ajudaram de alguma forma a concluir a minha graduação no curso mais incrível, a Biologia, que me fez perceber toda a energia da Natureza que nos cerca, e que me mostrou que cada um tem um papel a cumprir, mesmo que pequeno diante de tanta grandiosidade, muito importante como qualquer peça de um quebra-cabeça.

É bom ter um fim para a jornada, mas é
a jornada que importa no fim.
Ursula K. LeGuin

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA	4
3.2 AGES E EFEITOS ASSOCIADOS	6
3.3 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA	8
3.3.1 O gene RAGE	8
3.3.2 Polimorfismos de RAGE	9
3.3.3 Estrutura do Receptor RAGE	13
3.3.4 Interação AGE-RAGE e seus efeitos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 AMOSTRA	18
4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DA REGIÃO DO PROMOTOR E DO EXON 3 DO GENE RAGE ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	18
4.2.1 Promotor	18
4.2.2 Exon 3	19
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose	20
4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO DO PROMOTOR E DO EXON 3 DO GENE RAGE	21

4.3.1 Genotipagem dos polimorfismos da região do promotor do gene RAGE com a enzima <i>Tsp509I</i> para restrição da região do promotor de RAGE	21
4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos do exon 3 do gene RAGE com a enzima <i>AluI</i>	21
4.3.3 Identificação dos tamanhos dos fragmentos de restrição	22
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
5. RESULTADOS	24
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	24
5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS DAS REGIÕES PROMOTORA E DO EXON 3 DO GENE RAGE	24
5.2.1 Análise da variabilidade da 63 Del	25
5.2.2 Análise da variabilidade do polimorfismo -429 T>C	27
5.2.3 Análise da variabilidade do polimorfismo -374 T>A	30
5.2.4 Análise da variabilidade do polimorfismo G82S	33
5.3 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AFGP	1-alquil-2-formil-3,4-diglucosil-pirrol
AGEs	produtos finais de glicação avançada (<i><u>A</u>dvanced <u>G</u>lycation <u>E</u>nd Products</i>)
CML	N ^ε -(carboximetil)lisina
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i><u>D</u>eoxyribo<u>n</u>ucleic <u>A</u>cid</i>)
DN-RAGE	RAGE sem a cauda citosólica (<i>dominant negative RAGE</i>)
DP	desvio padrão
FFI	2-(furoil)-4(5)-(2furanil)-1H-imidazol
IL	interleucinas
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i><u>L</u>ow <u>D</u>ensity <u>L</u>ipoprotein</i>)
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (<i><u>M</u>ajor <u>H</u>istocompatibility <u>C</u>omplex</i>)
NF-κB	fator nuclear-κB (<i>nuclear factor κB</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i><u>P</u>olymerase <u>C</u>hain <u>R</u>eaction</i>)
RAGE	receptor para produtos finais de glicação avançada (<i><u>R</u>eceptor for <u>A</u>dvanced <u>G</u>lycation <u>E</u>nd Products</i>)
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (<i><u>R</u>estriction <u>F</u>ragment-<u>L</u>ength <u>P</u>olymorphism</i>)
SNP	polimorfismo de único nucleotídeo (<i><u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olymorphism</i>)
sRAGE	RAGE solúvel (<i>soluble RAGE</i>)
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA
TNFα	fator de necrose tumoral α (<i><u>T</u>umour <u>N</u>ecrosis <u>F</u>actor</i>)
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA QUÍMICA DE AGES	4
FIGURA 2	MODELO ESQUEMÁTICO DA GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS, FORMAÇÃO DE AGES E REAÇÃO DE <i>CROSS-LINK</i> ENTRE PROTEÍNAS	6
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DO GENE RAGE	9
FIGURA 4	MAPA DE POLIMORFISMOS DO GENE RAGE	9
FIGURA 5	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR RAGE	14
FIGURA 6	ESQUEMA DO RECEPTOR RAGE E SUAS VARIANTES, sRAGE E DN-RAGE	15
FIGURA 7	PRINCIPAIS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO AGE-RAGE RELACIONADAS COM COMPLICAÇÕES DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	17
FIGURA 8	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES PROMOTORA E DO ÉXON 3 DO GENE RAGE	25
FIGURA 9	PERFIL ELETROFORÉTICO DA 63 DEL DO AMPLICON DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	26
FIGURA 10	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE GERADO COM A ENZIMA <i>AluI</i>	29
FIGURA 11	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	28
FIGURA 12	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	29

FIGURA 13	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE GERADO COM A ENZIMA <i>Tsp509I</i>30
FIGURA 14	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE31
FIGURA 15	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -374 T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....31
FIGURA 16	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE GERADO COM A ENZIMA <i>AluI</i>33
FIGURA 17	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE34
FIGURA 18	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA	19
TABELA 2	PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA	19
TABELA 3	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO DO EXON 3	20
TABELA 4	PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO DO EXON 3	20
TABELA 5	CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA <i>Tsp509I</i>	21
TABELA 6	CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA <i>AluI</i>	22
TABELA 7	CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO DO EXON 3 COM A ENZIMA <i>AluI</i>	22
TABELA 8	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	24
TABELA 9	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA 63 DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	27
TABELA 10	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	28
TABELA 11	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -374 T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	34
TABELA 12	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE	38
TABELA 13	FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS	36

TABELA 14	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A NO GRUPO DE EURO-BRASILEIROS37
TABELA 15	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A NO GRUPO DE AFRO-BRASILEIROS37
TABELA 16	COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DE RAGE OBTIDOS NESTE TRABALHO COM OS REPORTADOS POR OUTROS AUTORES PARA DIFERENTES POPULAÇÕES43

RESUMO

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas. Quando ativado por seus ligantes, como os AGEs (produtos finais de glicação avançada) e as S100/calgranulinas, RAGE pode desencadear resposta pró-inflamatória e, possivelmente atuar nas complicações de processos patológicos como a aterosclerose e o diabetes. O gene RAGE tem cerca de 30 polimorfismos já identificados, e entre eles estão os polimorfismos da região promotora -429 T>C, -374 T>A e a 63 Del (-407 a -345), responsáveis pelo aumento da expressão de RAGE, bem como o do exon 3, o polimorfismo G82S ou GS (Gly→Ser no códon 82), associado a dermatoses em diabéticos. O objetivo deste estudo foi determinar as freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos de RAGE, nas regiões anteriormente citadas, em uma população Brasileira saudável etnicamente classificada. Uma amostra da população Brasileira (n=132) foi caracterizada fenotipicamente em Euro-Brasileiros (n=62) e Afro-Brasileiros (n=70). O grupo Euro-Brasileiro foi constituído de homens/mulheres: 25,8%/74,2%, com idade média de $42,4 \pm 12,7$ anos, e o grupo Afro-Brasileiro composto por homens/mulheres: 50,0%/50,0%; com idade média de $50,9 \pm 17,6$ anos. Esta pesquisa tem a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (HC/UFPR). Os genótipos foram determinados por PCR-RFLP, utilizando as enzimas *A1u1* (AG↓CT) e *Tsp509I* (↓AATT); os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%; 29:1) e visualizados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta. Todas as freqüências genótípicas seguem o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). As freqüências genótípicas e alélicas encontradas para Euro-Brasileiros foram respectivamente: -429 (75,8% T/T, 24,2% T/C+C/C e T;C = 0,871;0,129), -374 (38,7% T/T, 61,3% T/A+A/A e T;A = 0,653;0,347), G82S (95,2% G/G, 4,8% G/S+S/S e G;S = 0,976;0,024); e para Afro-Brasileiros: -429 (77,2% T/T, 22,8% T/C+C/C e T;C = 0,879;0,121), -374 (60,0% T/T, 40,0% T/A+A/A e T;A = 0,769;0,231), G82S (98,6% G/G, 1,4% G/S+S/S e G;S = 0,993;0,007). Cinco indivíduos do grupo de Afro-Brasileiros (7,1%) apresentaram a 63 Del em heterozigose. As freqüências alélicas e genótípicas para os polimorfismos -429 T>C e G82S mostraram-se similares ($P > 0,05$) nos dois grupos. O grupo Afro-Brasileiro mostrou uma freqüência significativamente menor do alelo -374A quando comparado ao Euro-Brasileiro ($P = 0,041$). Os polimorfismos -429 T>C e -374 T>A estão em absoluto desequilíbrio de ligação ($D' = 1$) nos dois grupos étnicos investigados. Nossos resultados foram similares aos encontrados para o G82S em brasileiros, índios asiáticos e tchecos; bem como aos encontrados para os polimorfismos da região promotora -429 T>C, -374 T>A e 63 Del em uma população de diabéticos tipo 2 de caucasóides e Afro-Brasileiros. Esta é a primeira descrição da freqüência desses polimorfismos em uma população Brasileira saudável.

Palavras-chave: gene RAGE; polimorfismos, populações.

ABSTRACT

The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a multi-ligand member of the immunoglobulin superfamily of cell surface proteins. When activated by its ligands, such as AGEs (advanced glycation end products) and S100/calgranulins, RAGE induces the activation of proinflammatory pathways which may be involved in several pathologies such as atherosclerosis and diabetes. RAGE gene is known to have about 30 polymorphisms already identified, among which are the promoter region polymorphisms -429 T>C, -374 T>A and 63 Del (-407 to -345) related to increased expression of RAGE, as well as the exon 3 polymorphism, G82S or GS (Gly→Ser in codon 82) associated to skin disorders in diabetic patients. The aim of this study was to determine the allele and genotype frequencies of RAGE polymorphisms above cited of the promoter region and the exon 3 in a healthy Brazilian population ethnically classified. A sample of the Brazilian population (n=132) was phenotypically characterized in Euro-Brazilians (n=62) and Afro-Brazilians (n=70). The Euro-Brazilian group consisted of men/women: 25.8%/74.2%; aged 42.4 ± 12.7 years, and the Afro-Brazilian group consisted of men/women: 50.0%/50.0%; aged 50.9 ± 17.6 years. The University Committee for Ethics in Human Research (HC/UFPR) approved this study. The genotyping was performed by PCR-RFLP with the restriction enzymes *A1u1* (AG↓CT) and *Tsp509I* (↓AATT). The PCR fragments were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (10%; 29:1), stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The genotype and allele frequencies for the Euro-Brazilians were: -429 (75.8% T/T, 24.2% T/C+C/C e T;C = 0.871;0.129), -374 (38.7% T/T, 61.3% T/A+A/A e T;A = 0.653;0.347), G82S (95.2% G/G, 4.8% G/S+S/S e G;S = 0.976;0.024), and for the Afro-Brazilians were: -429 (77.2% T/T, 22.8% T/C+C/C e T;C = 0.879;0.121), -374 (60.0% T/T, 40.0% T/A+A/A e T;A = 0.769;0.231), G82S (98.6% G/G, 1.4% G/S+S/S e G;S = 0.993;0.007). The genotype frequencies met Hardy-Weinberg equilibrium expectations in both sub-populations for all the polymorphisms analyzed ($P > 0.05$). Heterozygotes for the 63 Del were detected in five samples (7.1%) all in the Afro-Brazilian group. The genotype and allele frequencies of the polymorphisms -429 T>C and G82S were similar within the two groups ($P > 0.05$). The Afro-Brazilians showed a lower frequency of allele -374A when compared to Euro-Brazilians ($P = 0.041$). Polymorphisms -429 T>C and -374 T>A are in linkage disequilibrium ($D' = 1$) in both investigated groups. Our results were similar to those reported for G82S in Brazilian, Asian Indian and Czech subjects; as well as to those found for promoter region polymorphisms -429 T>C, -374 T>A e 63 Del in type 2 diabetic Afro-Brazilians. This is the first description of these polymorphisms in a healthy Brazilian population.

Key-words: RAGE gene, polymorphisms, population.

1. INTRODUÇÃO

Produtos finais de glicação avançada (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. As complicações associadas ao diabetes têm sido relacionadas à formação dos AGEs (HUDSON et al., 2001).

AGEs interagem com o receptor para produtos finais de glicação avançada (o RAGE), ativando vias pró-inflamatórias e pró-coagulantes (MIYATA et al., 1997; NAGARAJ et al., 1996). RAGE é membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular e é expresso em vários tipos celulares. A expressão de RAGE é aumentada em situações de aumento da ativação celular, quando ocorre acúmulo de AGEs, como no *Diabetes mellitus*, na resposta inflamatória e na doença de Alzheimer (HUDSON et al., 2002; NISHIKAWA et al., 2000; SCHMIDT E STERN, 2000).

O gene RAGE está localizado no cromossomo 6p21.3, próximo ao complexo de histocompatibilidade (SUGAYA et al., 1994, GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769) e, até o momento, já foram identificados cerca de 30 polimorfismos em sua seqüência. Na região promotora de RAGE foram encontrados os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e a deleção de 63 bp, ou 63 Del (-407 a -345), que têm sido mostrados como responsáveis pelo aumento da expressão do gene RAGE (SANTOS et al., 2005). Esta região está envolvida na regulação da expressão gênica de RAGE e, portanto, é um importante alvo de estudo visto que variações nesta região podem aumentar ou reduzir a expressão de RAGE. O exon 3 é a provável região codificadora do sítio de interação ligante-receptor, portanto, alterações como o polimorfismo G82S (transição de guanina para adenina na posição 555) associado a dermatoses em diabéticos (HUDSON et al., 2002), podem estar associadas a modificações na interação ligante-RAGE. Estudos de associação

destes polimorfismos com as complicações do diabetes e outras doenças têm sido reportados, entretanto, os resultados ainda são conflitantes.

Estudos anteriores desenvolvidos neste laboratório indicaram uma possível associação entre as frequências destes polimorfismos e etnias. O estudo das frequências genóticas e alélicas destas mudanças ainda não foi descrito para indivíduos saudáveis na população brasileira, e como há uma possível influência destas alterações nas complicações associadas ao diabetes e outras patologias, como a doença de Alzheimer, é necessário determinar sua distribuição na população brasileira saudável para formar uma base de dados. Esta base permitirá comparar as frequências encontradas em diferentes etnias com os Afro-Brasileiros e Euro-Brasileiros do nosso estudo, e possibilitará determinar se a associação destes polimorfismos a doenças é real, ou se a variação é devida somente ao componente étnico da população investigada.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a frequência de polimorfismos do gene RAGE (receptor para os produtos finais de glicação avançada), -429T>C, -374T>A e deleção de 63 bp da região promotora, e G82S da região do exon 3, em amostras de DNA de indivíduos saudáveis categorizados fenotipicamente em Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros, comparando a frequência alélica e genotípica entre estes grupos étnicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a região promotora e a região do exon 3 do gene RAGE;
- Determinar a frequência da 63 Del da região promotora de RAGE através de eletroforese de agarose dos produtos de PCR;
- 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 *AluI* e *Tsp509I*, respectivamente; e o polimorfismo G82S da região do exon 3, utilizando a enzima de restrição *AluI*;
- Identificar os fragmentos de restrição dos polimorfismos -429T>C, -374 T>A e G82S através de eletroforese em gel poliacrilamida;
- Determinar as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos -429T>C e -374 T>A da região promotora;
- Comparar os dados obtidos com dados reportados na literatura para outras etnias.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

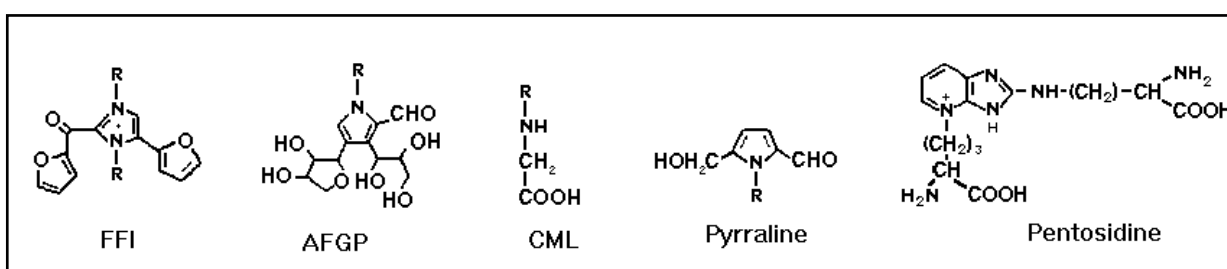
3.1 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

Produtos finais de glicação avançada (AGEs: *Advanced Glycation End Products*) 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).

Segundo BROWNLEE (1995), os AGEs são gerados a partir dos chamados produtos de Amadori, 1-amino-1-deoxicetose, produzidos pela reação de glucose com proteínas. Produtos análogos são formados pela reação entre outras aldoses e proteínas. A taxa de formação de produtos de Amadori é diretamente proporcional à concentração e ao tempo de exposição à glucose, por isso, as complicações associadas ao diabetes (doenças micro-vasculares e macro-vasculares) têm sido relacionadas à formação dos AGEs (HUDSON et al., 2001).

Um grande número de AGEs (Figura 1) têm sido isolado ou sintetizado *de novo*. Os mais estudados são a carboxi(metil)lisina (CML, N^ε-(carboximetil)lisina) (AHMED et al., 1986) e a pentosidina (SELL et al., 1989). Entre outros, também são citados na literatura: 2-2(furoil)-4(5)-(2furanil)-1H-imidazol (FFI) (PONGOR et al., 1984), pirralina (NJORGE et al., 1987), 1-alquil-2-formil-3,4-diglicil-pirrol (AFGP) (FARMAR et al., 1988), e mais recentemente 3-deoxiglucosona (SINGH et al., 2001).

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE AGES.



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

A formação de AGEs ocorre pela natureza reativa de açúcares redutores, como a glucose que, por meio de seus grupos aldeídos ou cetonas, reagem não-enzimaticamente com grupos amino livres de proteínas, produzindo uma ligação irreversível (HUDSON et al., 2002). Esta reação foi descrita primeiramente por Luis-Camille Maillard em 1912 (HUTTUNEN, 1996).

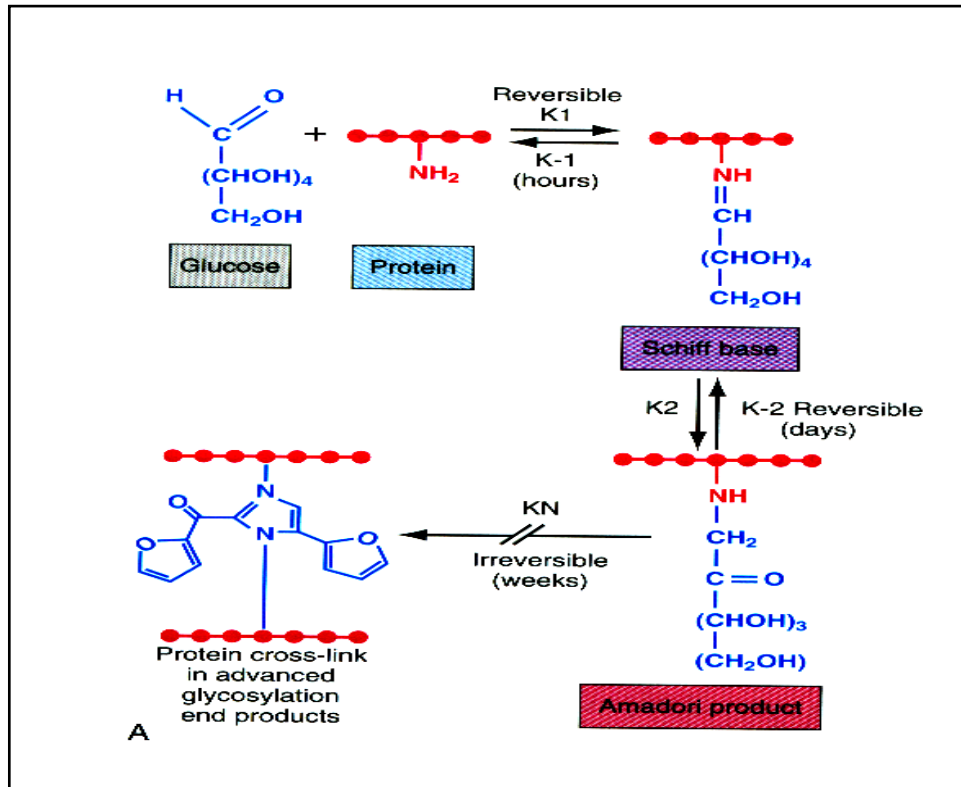
A glucose é o açúcar preferencial para o processo de glicação (ou glicosilação) *in vivo* por ser o carboidrato mais abundante no plasma, no entanto, outros açúcares também podem levar à formação de produtos de glicação.

O mecanismo de formação dos AGEs (Figura 2) ainda não foi completamente elucidado, porém uma das possíveis vias de síntese pode ser descrita em três etapas principais (NAGARAJ et al. 1996; HUDSON et al. 2002): (1) formação da base reversível de Schiff e produtos de Amadori estáveis; (2) rearranjos destes grupos em estruturas químicas mais complexas e reativas; e (3) formação dos produtos de Maillard ou AGEs.

Esta seqüência de reações é lenta e espontânea, podendo demorar semanas ou meses (HARDING, 1985; HUTTUNEN, 1996), no entanto evidências sugerem que outros precursores de AGEs como frutose, glucose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, reagem mais rapidamente com proteínas que a glucose, 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 glucose (MCPHERSON, 1988).

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: COTRAN et al., 1999.

3.2 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 de vasos sanguíneos; (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 através de estresse oxidativo e da ativação de fatores de transcrição.

Os AGEs estão intimamente relacionados com diversas patologias, como por exemplo, doenças vasculares, complicações micro-vasculares e macro-vasculares do diabetes e arteriosclerose. O efeito mais conhecido dos AGEs é a sua

capacidade de formar pontes (*cross-linking*) entre proteínas gerando efeitos tóxicos no organismo.

BROWNLEE et al. (1986) e KENT et al. (1985) evidenciaram que a formação de AGEs extracelular altera as propriedades funcionais de diversos componentes da matriz importantes, como o colágeno, levando a formação de pontes com proteínas plasmáticas como a imunoglobulina G e lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), contribuindo para o estreitamento do lúmen dos vasos (BROWNLEE et al., 1985; BROWNLEE et al., 1983).

A formação de AGEs extracelular inibe ainda a associação lateral do colágeno tipo IV para formar a estrutura normal da membrana basal (TSILBARY et al., 1988). Laminina glicada tem sua polimerização reduzida e a sua ligação com colágeno tipo IV e heparan sulfato é prejudicada (CHARONIS et al., 1990). Ou seja, a formação de AGEs na matriz extracelular interfere tanto nas interações matriz-matriz quanto nas interações matriz-célula, e a estrutura de vasos parece ser alterada por estas anormalidades.

A formação de AGEs intracelular também gera perturbações, pois a glicação de proteínas celulares pode levar à perda ou alteração de função (HUDSON et al., 2002). AGEs podem também afetar a função do DNA, pelo menos *in vitro* estes compostos podem gerar mutações e transposição em procariontes e em células de mamíferos, modificando a expressão gênica (BUCALA et al. 1993; 1984).

Vários receptores celulares que apresentam capacidade de ligação com os AGEs já foram identificados, dentre os quais estão:

1. Receptor *scavenger* de monócitos e macrófagos (ARAKI et al., 1995; SUZUKI et al., 1997; VLASSARA et al., 1986, VLASSARA et al., 1985);
2. Duas proteínas relacionadas à ligação com AGEs, uma de 60 kDa (P60) e outra de 90 kDa (P90), foram isoladas de fígado de rato (YANG et al., 1991);
3. Duas proteínas isoladas de células endoteliais, uma de 35 kDa, semelhante à lactoferrina, e outra de 46 kDa, com nova seqüência N-terminal (BROWNLEE, 1995);
4. Proteína de 32 kDa designada de galectina-3 (VLASSARA et al., 1995);
5. AGE-R1-3 (LI et al., 1996; VLASSARA et al., 1995);
6. CD-36 (KUNYASU et al., 2003; OHGAMI et al., 2001);

7. LOX-1 (JONO et al., 2002);
8. OST-48 e 80K-H (EL KHOURY et al., 1994; NEEPER et al., 1992);
9. Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE). Este é o receptor de AGEs melhor caracterizado até o momento: a ativação de RAGE pela ligação com AGE gera estresse oxidativo (BROWNLEE, 1995). Até o momento, a maioria dos estudos corrobora que RAGE é o receptor com papel central na biologia e patogênese de AGEs.

Evidências apontam os AGEs como responsáveis pelas complicações no diabetes, e estas são corroboradas pelos efeitos inibitórios da aminoguanidina, composto que previne a formação de AGEs e reduz a severidade dessas complicações em modelos animais. Entretanto, ainda não se sabe se a inibição farmacológica será a mesma em humanos (BROWNLEE, 1995 e 1993).

Alguns estudos sugerem a existência de enzimas que detoxificam precursores de AGEs, prevenindo a sua formação. A natureza e eficiência dessas enzimas pode ser um fator determinante da quantidade de AGEs que é formado em qualquer nível de glucose em diabéticos ou indivíduos saudáveis (BROWLEE, 1995).

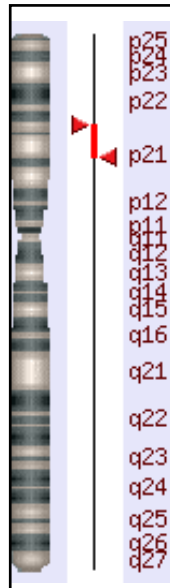
A literatura (BROWLEE, 1995) ainda sugere que a glicação da proteína β -amilóide solúvel acelera a sua agregação, relacionando os AGEs ao desenvolvimento mais rápido da doença de Alzheimer.

3.3 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

3.3.1 O gene RAGE

O gene do receptor para os produtos de glicação avançada (RAGE: *Receptor for Advanced Glycation End Products*) humano foi mapeado no cromossomo 6p21.3 (Figura 3), e uma análise desta região determinou a proximidade deste gene com o complexo principal de histocompatibilidade classe III (MHCIII) (SUGAYA et al., 1994, GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769).

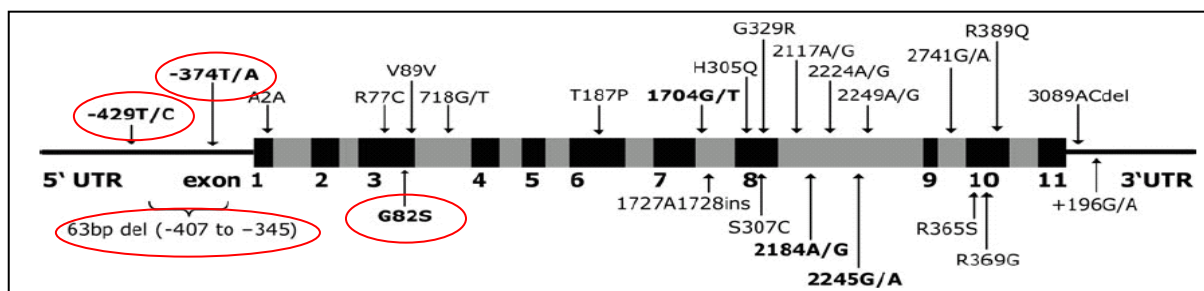
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DO GENE RAGE.



Fonte: SCHMIDT e STERN, 2000.

Este gene é composto por 11 exons e 10 introns e já foram identificados 30 polimorfismos nas seqüências de DNA da região promotora, exons, introns e regiões 5' e 3' UTR do gene RAGE. A Figura 4 (KANKOVÁ et al., 2005) mostra as principais variantes descritas entre exons e introns de RAGE.

FIGURA 4 - MAPA DE POLIMORFISMOS DO GENE RAGE.



Variantes mais comuns marcadas em negrito; polimorfismos analisados neste estudo circulos em vermelho (adaptado de KANKOVÁ et al., 2005).

3.3.2 Polimorfismos de RAGE

Vários estudos indicam um possível papel dos polimorfismos do gene RAGE como mediadores de função alterada do receptor, associando-os às complicações

micro-vasculares e macro-vasculares do diabetes (DING et al., 2005). Contudo, em sua maioria, os polimorfismos de RAGE são responsáveis apenas por raras alterações em regiões codificadoras, ou ainda por alterações localizadas em regiões não codificadoras (HUDSON et al., 1998). Este pode ser o motivo de a maioria dos estudos de associação que investigam a relação entre os polimorfismos de RAGE e complicações do diabetes, apresentarem resultados negativos ou controversos (KANKOVÁ et al., 2005).

HUDSON et al. (2001) identificaram a repetição de três nucleotídeos -1420 (GGT)_n e as substituições -1393 G>T, -1390 G>T, -1202 G>A, -429 T>C, -374 T>A e a 63 Del (deleção da região -407 a -345) na região promotora de RAGE, além da substituição +20 T>A da região 5' UTR. Destes, foi demonstrado que os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e 63 Del alteram a expressão do gene RAGE. Em outro trabalho, HUDSON et al. (1998), descreveram nove polimorfismos no gene RAGE, sete localizados nos exons e dois nos introns. Entre estes polimorfismos, quatro geram troca de aminoácidos: *T187P* (exon 6), *G329R* (exon 8), *R389Q* (exon 10) e *G82S* (exon 3). Apenas o polimorfismo *G82S* (exon 3) foi encontrado em mais de uma amostra.

A transição 2184 A>G no intron 8 pode estar situada no sítio regulatório de interação com os ligantes, e foi associada ao status antioxidante de pacientes diabéticos (KANKOVÁ et al, 2001). KANKOVÁ et al. (2005) encontraram ainda uma maior frequência do alelo 2184G em um grupo de diabéticos com nefropatia.

YOSHIOKA et al. (2005) não encontraram relação entre o polimorfismo *G1704T* e microalbuminúria (estágio inicial de nefropatia) em japoneses diabéticos tipo 2. Estes resultados são divergentes daqueles encontrados por MATSUNAGAIRIE et al. (2004) que observaram uma fraca relação entre *G1704T* e nefropatia em japoneses diabéticos tipo 2, o que pode ser devido à pequena amostra analisada pelo último. Este polimorfismo ocorre num intron de RAGE, e ainda não foi determinado se apresenta algum efeito funcional.

Variações em regiões que codificam o sítio de interação ligante-receptor, como o exon 3, ou em regiões responsáveis pela regulação da expressão de RAGE, como o promotor, são importantes alvos das pesquisas porque podem alterar a ativação e sinalização do receptor RAGE. Polimorfismos da região promotora podem

estar envolvidos com modificação da regulação gênica, aumentando ou diminuindo a expressão de RAGE (SANTOS et al., 2005).

Recentemente, RUDOFISKY et al. (2004) descreveram uma redução do risco para nefropatia em diabéticos associada a 63 Del da região promotora em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2, que representa a perda dos nucleotídeos -405 a -345 do promotor de RAGE. Ainda, HUDSON et al. (2002) relataram um aumento da expressão gênica de RAGE em indivíduos com esta deleção.

De acordo com HUDSON et al. (2002), o polimorfismo -429T>C da região promotora de RAGE não apresenta associações com isquemia cardíaca, tanto em diabéticos quanto em não diabéticos, porém foi observada associação do alelo -429C com retinopatia em diabéticos tipo 2 (HUDSON et al., 2001). KANKOVÁ et al. (2005) encontraram associação entre o alelo -429C e nefropatia em pacientes diabéticos. Dados reportados por HUDSON et al. (2001) mostram que a presença do resíduo T na posição -429 (alelo -429T) causa um aumento da atividade transcricional do promotor de duas vezes quando comparado com o resíduo C na mesma posição (alelo -429C).

Em estudo recente SCHENK et al. (2001) relatam que o alelo -374A, do polimorfismo -374 T>A da região promotora de RAGE está associado com aumento da frequência de câncer de células pulmonares não-pequenas (*non-small cell lung cancer*). No entanto, HUDSON et al. (2002) não observaram associação entre este polimorfismo e isquemia cardíaca em diabéticos e não diabéticos, bem como com retinopatia em diabéticos.

PETTERSSON-FERNHOLM et al. (2003) investigaram os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e G82S em diabéticos tipo 1 de uma população finlandesa, e os resultados indicaram que o genótipo -374 A/A tem papel de proteção contra o desenvolvimento de doença coronariana, além de associação do polimorfismo -374 T>A com nefropatia nos indivíduos pertencentes a esta amostra. Entretanto, POIRIER et al. (2001) não encontraram esta associação quando estudaram franceses diabéticos tipo 1.

SANTOS et al. (2005) não encontraram relação entre a presença dos polimorfismos -429 T>C e 63 Del e retinopatia, nefropatia e isquemia cardíaca em

pacientes diabéticos tipo 2 caucasóides e afro-brasileiros. Por outro lado estes autores reportaram uma associação do alelo -374A com a redução do risco de isquemia em diabéticos tipo 2 afro-brasileiros. FALCONE et al. (2004) descreveram uma associação entre o genótipo -374 A/A e redução da suscetibilidade à doença arterial coronariana. Segundo HUDSON et al. (2002) esta substituição gera a perda de um sítio de ligação a um complexo de proteínas repressoras da transcrição de RAGE, aumentando, portanto, o nível de expressão do gene RAGE.

No polimorfismo G82S a substituição de guanina por adenina (G→A) na posição 555 do exon 3 de RAGE gera mudança de resíduo de aminoácidos no códon 82 (GGC→AGC), com substituição de glicina (G, Gly) por serina (S, Ser). O exon 3 codifica para uma região de RAGE envolvida na interação com seus ligantes, portanto, alterações em resíduos de aminoácidos (não-sinônimas) desta região da proteína são particularmente interessantes, já que podem alterar a resposta de RAGE à ligação com AGEs. Apesar do polimorfismo G82S ocorrer no provável sítio de interação com os ligantes, não é possível prever os efeitos estruturais deste polimorfismo já que a estrutura terciária de RAGE não é conhecida, no entanto, evidências sugerem que o G82S está associado com dermatoses em diabéticos (HUDSON et al., 2002).

Estudos *in vitro* mostram que a presença do genótipo S/S em macrófagos está associada com o aumento da afinidade entre AGEs e RAGE, amplificando a resposta pró-inflamatória mediada por interleucinas (IL-1 α , IL-6) e pelo TNF α (fator de necrose tumoral α). Estes dados corroboram a hipótese de que o genótipo S/S (homozigoto) pode estar relacionado com a resposta inflamatória anormal em complicações vasculares (HUDSON et al., 2002).

Não foi encontrada diferença na frequência genotípica ou alélica do polimorfismo G82S entre indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2 com ou sem doença macrovascular numa população de asiáticos e caucasóides (HUDSON et al., 1998). YOSHIOKA et al. (2005) não encontraram relação **entre o polimorfismo G82S com microalbuminúria (estágio inicial de nefropatia) em diabéticos tipo 2 em uma população japonesa.**

Por outro lado, KANKOVÁ et al. (1999) observaram uma maior frequência do genótipo S/S em indivíduos diabéticos com *Psoriasis vulgaris* e em 2002, o mesmo

grupo de pesquisadores obteve resultados semelhantes ao analisar diabéticos com outras dermatoses (HUDSON et al., 2002). KUMARAMANICKAVEL et al. (2002) também encontraram relação entre o polimorfismo G82S e retinopatia em diabéticos.

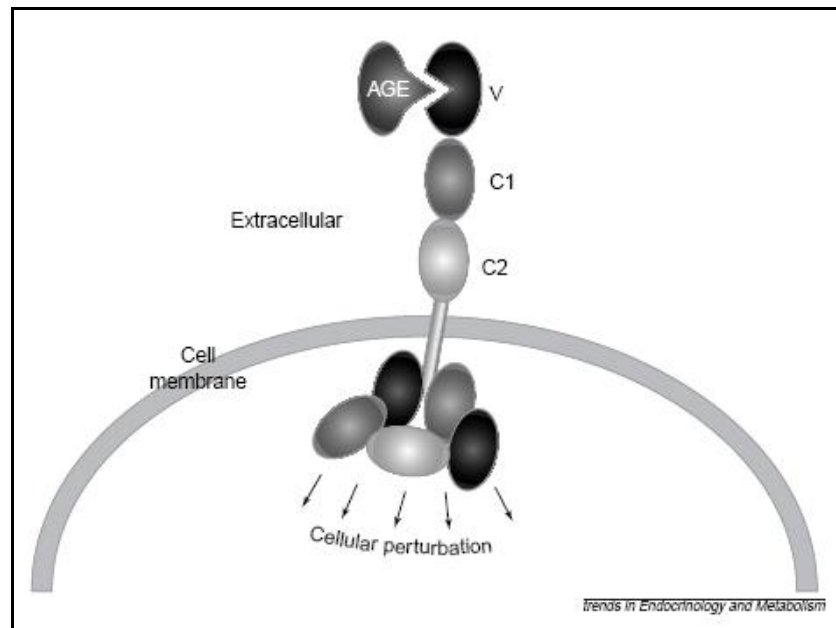
Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a divergência entre os resultados de associação dos polimorfismos de RAGE e doenças como o diabetes, incluindo as diversas origens das populações chamadas caucasóides (Inglaterra, Eslovênia, Finlândia, China, Itália, França, entre outros), diversidade de etnias nos estudos, diferenças de expressão do gene RAGE *in vitro* e *in vivo* (RUDOFISKY et al., 2004), desequilíbrio de ligação entre os alelos -429C e -374A ou entre os polimorfismos do gene RAGE e regiões adjacentes ou próximas que conferem susceptibilidade ou proteção às complicações do diabetes (SANTOS et al., 2005).

3.3.3 Estrutura do Receptor RAGE

Segundo SCHMIDT e STERN (2000) o receptor RAGE é uma proteína de aproximadamente 45 kDa, membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular. A região extracelular de RAGE consiste de três domínios de imunoglobulina: um N-terminal do tipo V (variável), seguido por dois do tipo C (constante) estabilizados por pontes de enxofre internas entre resíduos de cisteína. Uma única região transmembrana fixa o receptor RAGE na membrana e uma cauda citosólica pequena de 43 resíduos de aminoácidos, altamente carregada, interage com as moléculas de transdução de sinal citosólicas.

O sítio de interação com AGEs parece estar localizado numa região que compreende os 30 primeiros resíduos de aminoácidos do domínio V (SCHMIDT et al., 1997). Apesar de não interagirem com os ligantes, os domínios C parecem ter importante papel na estabilização do domínio V (SCHMIDT et al., 2000). A Figura 5 mostra uma representação esquemática da estrutura do receptor RAGE e sua interação com os AGEs através do domínio V.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR RAGE.

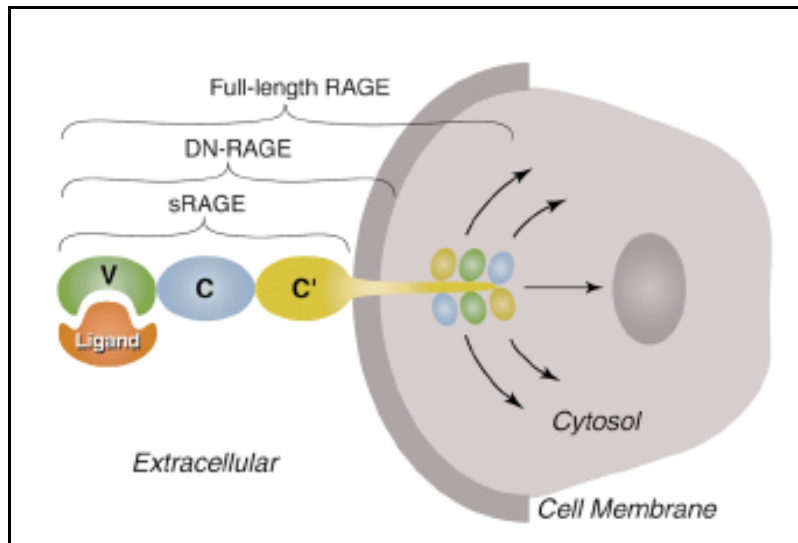


Fonte: SCHMIDT e STERN, 2000.

Três formas do receptor RAGE resultantes de *splicing* alternativo são conhecidas (Figura 6) (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 apresenta a cauda citosólica deletada (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. Foram ainda identificadas proteínas de 48 kDa e 23 kDa de células neuronais, provavelmente resultado de processamento pós-traducional de RAGE (BRETT et al., 1993).

FIGURA 6 – ESQUEMA DO RECEPTOR RAGE E SUAS VARIANTES, sRAGE E DN-RAGE.



Fonte: SCHMIDT e STERN, 2001.

RAGE é expresso em baixos níveis em uma gama de tipos celulares, como células endoteliais vasculares, células musculares lisas, células glomerulares, macrófagos e monócitos (BRETT et al., 1993). Em situações de aumento da ativação celular ou no desenvolvimento do diabetes, inflamação e doença de Alzheimer, a expressão de RAGE é extraordinariamente aumentada na retina, nas células glomerulares (epiteliais e mesangiais) e na aorta (SCHMIDT e STERN, 2000; SOULIS et al., 1997; RITTHALER et al., 1995).

Uma das peculiaridades de RAGE é a sua capacidade de reconhecer famílias de ligantes, permitindo a sua participação em um amplo espectro de eventos fisiopatológicos, relacionados principalmente à propagação de disfunção celular. O RAGE interage com ligantes estruturalmente distintos, mas com conformações semelhantes, permitindo reconhecimento de uma variedade de seqüências primárias; este fato demonstra a importância do entendimento da estrutura do sítio de reconhecimento dos ligantes de RAGE (SCHMIDT et al., 2000).

Entre os principais exemplos de ligantes de RAGE, além dos AGEs, estão os polipeptídeos S100/calgranulinas e as anfoterinas (HMGB1) que desempenham papel de citocinas na resposta pró-inflamatória (SCHMIDT et al., 2000).

SELKOE (1994) cita a proteína β -amilóide, formada da proteólise da proteína amilóide, como mais um dos ligantes de RAGE, sugerindo o envolvimento deste receptor na doença de Alzheimer. Neste mesmo estudo foi demonstrado que RAGE atua como mediador do transporte da proteína β -amilóide através da barreira sanguínea do cérebro contribuindo para o seu depósito na membrana basal de vasos sanguíneos.

Outros estudos também têm reportado que RAGE pode atuar como receptor de moléculas de adesão celular possibilitando o recrutamento de leucócitos para as regiões onde RAGE é expresso (HUDSON et al., 2002; SINGH et al., 2001).

3.3.4 Interação AGE-RAGE e seus efeitos

HUDSON et al. (2002) afirmam que o acúmulo de AGE induz aumento da expressão de RAGE, portanto, receptor e ligante co-acumulam nos glomérulos renais, retina e aorta de diabéticos como consequência de hiperglicemia. Para SCHMIDT et al. (2000) a distribuição coincidente de receptor e ligante resulta em ativação prolongada do receptor, sugerindo uma alça de retro-alimentação positiva (*feedback* positivo), onde a interação ligante-receptor aumenta a expressão do receptor.

RAGE é um mediador da transdução de sinal que desencadeia (HUDSON et al., 2002) estresse oxidativo e ativação da expressão de fatores de transcrição, como por exemplo, o NF- κ B (fator nuclear- κ B), modulador da expressão de outros genes relacionados à resposta pró-inflamatória, ao estado de pró-coagulação e à vasoconstrição.

A ativação e translocação nuclear de NF- κ B ativam proteínas envolvidas na adesão de leucócitos ao endotélio, um processo implicado com o início de lesões ateroscleróticas e de outros distúrbios vasculares (COLLINS, 1993). A proteína VCAM-1 é expressa no endotélio de placas ateroscleróticas, e gera aumento da adesão de monócitos (O'BRIEN et al., 1993), que são recrutados por quimiotaxia aos sítios de acúmulo de AGEs (SCHMIDT et al., 1993). A interação AGE-RAGE causa ainda aumento da expressão de TF (fator tecidual) e de trombulina pelo endotélio (WESTWOOD et al., 1995) e macrófagos (ICHIKAWA et al., 1998), iniciando um estado de pró-coagulação. RAGE ativado também induz a expressão

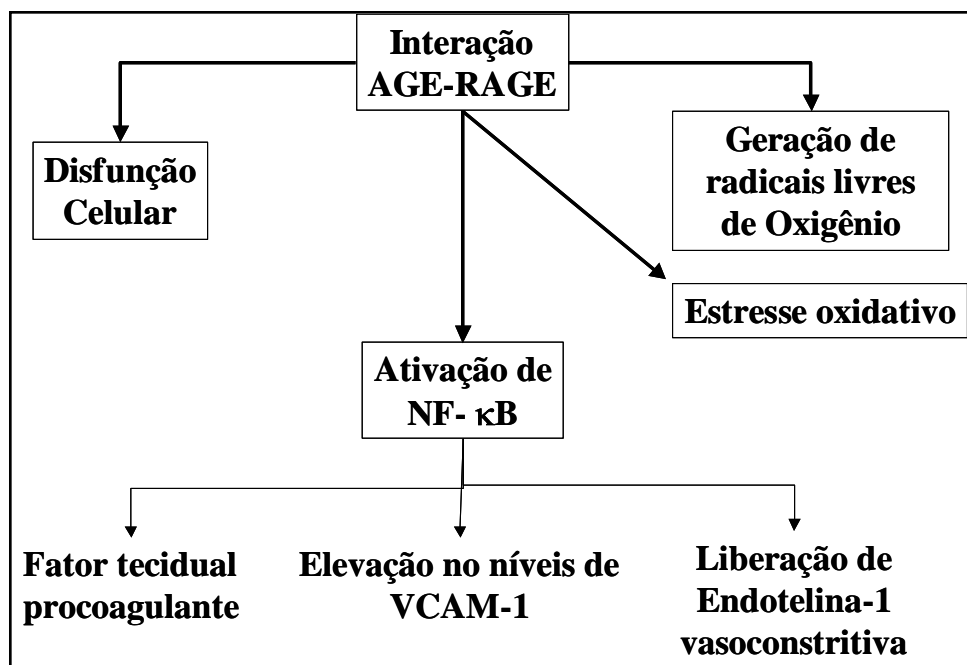
de endotelina-1, um potente vasoconstritor (QUEHENBERGER et al., 1995), que inibe a produção de prostaciclina e de óxido nítrico, contribuindo para a hipertensão em diabéticos. A inibição da produção de prostaciclina inicia retinopatia por perda de perócitos (YAMAGISHI et al., 1995).

A ativação do receptor RAGE gera ainda aumento nas concentrações de citocinas de resposta pró-inflamatória, como as interleucinas IL-1 α e IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF α) entre outros (SCHMIDT et al., 2000; SINGH et al., 2001; HUDSON et al., 2002).

Até o momento, a única forma conhecida de reduzir a expressão de RAGE é interromper a interação com seus ligantes através do uso de sRAGE ou de anticorpos que bloqueiam essa interação; sabe-se também que o tratamento com aminoguanidina reduz tanto os níveis de AGEs quanto a expressão de RAGE (SOULIS et al., 1997).

A Figura 7 esquematiza os principais efeitos da interação AGE-RAGE.

FIGURA 7 - PRINCIPAIS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO AGE-RAGE RELACIONADAS COM COMPLICAÇÕES DO *DIABETES MELLITUS*.



Fonte: Adaptado de LAPOLLA et al. (2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2 AMOSTRA

As amostras de DNA analisadas neste estudo, gentilmente cedidas pela Prof.^a Dra. Maria Luiza Petzl-Erler do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), foram coletadas em Curitiba de indivíduos saudáveis não aparentados no período de 1994 a janeiro de 2006. No momento da coleta, os indivíduos (132) foram categorizados fenotipicamente nos grupos Euro-Brasileiro (62) e Afro-Brasileiro (70).

A extração de DNA foi inicialmente realizada a partir de sangue total pelo método de *salting-out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991), e mais recentemente pelo método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989).

Este estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos do Hospital de Clínicas – UFPR – CEP-HC n° 327.037/2001-04.

4.2 AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA E DO EXON 3 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) sob condições descritas detalhadamente a seguir para cada região investigada do gene RAGE, promotor e exon 3.

4.2.1 Promotor

O fragmento da região promotora do gene RAGE contendo os polimorfismos em estudo (-429 T>C e -374 T>A, além da 63 Del), foi amplificado através de PCR utilizando como oligonucleotídeos iniciadores os descritos por HUDSON et al. (2001) que geram um amplicon de 344 bp, correspondente à região -590 à -246:

- 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 FINAL	VOLUME (μL)
DNA molde (20 ng/ μL)	~ 10 ng/ μL	5,0
Tampão <i>Taq</i> (10X)	1 X	1,0
MgCl ₂ (50 mmol)	1,5 mmol/L	0,3
dNTP (5mmol)	0,2 mmol/L	0,4
Oligonucleotídeos Iniciadores (5 pmol/ μL cada)	10 pmol (cada)	2,0
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/ μL)	2,5 U	0,5
Água Reagente tipo 1 estéril	q _s 10 μL	0,8
Volume final		10

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

TABELA 2 - PROGRAMA 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

4.2.2 Exon 3

A região do exon 3 do gene RAGE contendo o polimorfismo G82S foi amplificado através de PCR utilizando como oligonucleotídeos iniciadores os descritos por KANKOVÁ et al. (1999) que permitem a amplificação de um fragmento de PCR de 397 bp, correspondente às regiões do intron 1, exon 3 e parte do intron 3:

- E3 F: 5'- GTA AGC GGG GCT CCT GTT GAC -3';
- E3 R: 5'- GGC CAA GGC TGG GGT TGA AGG -3'.

As condições da reação de PCR para amplificação do fragmento da região do exon 3 do gene RAGE estão descritas nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 - CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO DO EXON 3.

REAGENTES E DNA	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME (μL)
DNA molde (20 ng/ μL)	~ 10 ng/ μL	5,0
Tampão <i>Taq</i> (10X)	1 X	1,0
MgCl ₂ (50 mmol)	1,5 mmol/L	0,3
dNTP (5mmol)	0,2 mmol/L	0,4
Oligonucleotídeos Iniciadores (5 pmol/ μL cada)	10 pmol (cada)	2,0
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/ μL)	2,5 U	0,5
Água Reagente tipo 1 estéril	qs 10 μL	0,8
Volume final		10

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

TABELA 4 - PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DA REGIÃO DO EXON 3.

NÚMERO DE CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TEMPO
1x	Desnaturação	94	3 minutos
	Desnaturação	94	40 segundos
34x	Anelamento	67	40 segundos
	Extensão	72	45 segundos
1x	Extensão Final	72	10 minutos

4.2.3 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 (~ 20 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 E DO EXON 3 DO GENE RAGE

A genotipagem foi realizada por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms*) que foi realizada após a obtenção dos produtos de amplificação gerados pela PCR (PCR-RFLP) 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 -374 T>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 5.

TABELA 5 - CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA *Tsp509I*.

REAGENTES	VOLUME (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Produto de PCR	1,25	~12 ng
NEBuffer 1 [10X]	0,5	1X
<i>Tsp509I</i> [10 U/ μL]	0,125	1,25 U
Água Reagente Tipo 1 estéril	3,125	qs 10 μL
Volume final	5	----

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

Tampão NEBuffer 1 [10X]: 100 mmol Bis-Tris propano-HCl; 100 mmol MgCl_2 ; 10 mmol ditioneitol, pH 7,0 a 25°C.

4.3.2 Genotipagem dos polimorfismos do exon 3 do gene RAGE com a enzima *AluI*

Para a determinação dos genótipos dos polimorfismos -429 T>C e G82S, da região promotora e do exon 3, respectivamente, os produtos de PCR dessas duas

regiões foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *AluI* (Invitrogen), conforme descrito nas Tabelas 6 (promotor) e 7 (exon 3).

TABELA 6 - CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA *AluI*.

REAGENTES	VOLUME (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Produto de PCR	1,25	~12 ng
Tampão React 1 [10X]	0,5	1X
<i>AluI</i> [10 U/ μL]	0,125	1,25 U
Água Reagente Tipo 1 estéril	3,125	qs 10 μL
Volume final	5	----
Homogeneizar e incubar a 37°C por 16 horas		
Tampão NEBuffer 1 [10X]: 100 mmol Bis-Tris propano-HCl; 100 mmol MgCl ₂ ; 10 mmol ditioneitol, pH 7,0 a 25°C.		

TABELA 7 - CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO DO EXON 3 COM A ENZIMA *AluI*.

REAGENTES	VOLUME (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Produto de PCR	1	~10 ng
Tampão React 1 [10X]	0,5	1X
<i>AluI</i> [10 U/ μL]	0,125	1,25 U
Água Reagente Tipo 1 estéril	3,375	qs 10 μL
Volume final	5	----
Homogeneizar e incubar a 37°C por 16 horas		
Tampão NEBuffer 1 [10X]: 100 mmol Bis-Tris propano-HCl; 100 mmol MgCl ₂ ; 10 mmol ditioneitol, 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 poliacrilamida 29:1 (10%) em tampão TBE 1X (Sistema Rubi, Amersham). As eletroforeses foram realizadas com 5 μL (~12ng) do produto de restrição misturados a 3 μL 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 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (302nm). As imagens foram capturadas Sistema Biochemi (UVP).

Tanto as condições da reação de restrição quanto as de PCR foram otimizadas pelo Prof.^o Geraldo Picheth em seu projeto de Doutorado junto ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste “t”, para amostras não pareadas, foi usado para comparar a idade média entre os grupos Euro-Brasileiro e Afro-Brasileiro, e para comparar a proporção entre homens e mulheres da amostra investigada, foi utilizado teste de Chi-quadrado (χ^2).

As freqüências genóticas e alélicas observadas para todos os polimorfismos investigados foram comparadas com as freqüências esperadas, de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, através do software disponível no seguinte endereço eletrônico www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/Popgen/genetik/applets /kitest.

As comparações das freqüências genóticas e alélicas foram realizadas pelo teste exato de Fisher bidirecional ou pelo teste do Chi-quadrado (χ^2), para verificar se as freqüências observadas se distribuem de forma similar entre os grupos étnicos investigados.

As análises que utilizaram os testes “t”, Chi-quadrado (χ^2) e exato de Fisher bidirecional foram processadas utilizando o software Statistica para Windows versão 5.5 (StaSoft, 2001); com exceção às análises de freqüências haplotípicas, que utilizaram o teste de contingência de Chi-quadrado (χ^2) e foram realizadas no software RxC (MILLER, 1997). A análise do desequilíbrio de ligação foi feita através software Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2006) disponível no site <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

Para o polimorfismo -374 T>A, não foram analisadas as amostras que apresentaram a 63 Del, porque estes polimorfismos ocorrem na mesma região do DNA, portanto, em fitas com a deleção, não há a região do polimorfismo -374 T>A.

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

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os indivíduos analisados neste estudo eram saudáveis, não aparentados e foram classificados fenotipicamente em Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros. Os dados antropomórficos estão mostrados na Tabela 8.

No grupo Euro-Brasileiro foi observada uma frequência significativamente maior de mulheres e menor de homens em relação ao Afro-Brasileiro. Por outro lado, o grupo de Afro-Brasileiros apresentou idade média significativamente maior.

TABELA 8 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.

	EURO-BRASILEIROS (62)	AFRO-BRASILEIROS (70)	P
Homens	16 (25,8%)	35 (50%)	
Mulheres	46 (74,2%)	35 (50%)	0,0044
Idade Média	42,4 ± 12,7	50,9 ± 17,6	0,0018

Valores da idade média são dados em anos. Variações significativas estão sublinhadas e em negrito.

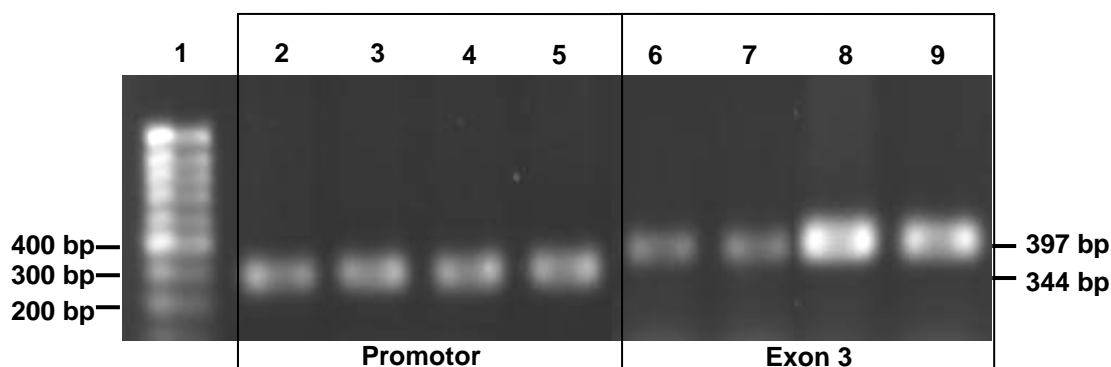
5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA E DO EXON 3 DO GENE RAGE

Para todos os polimorfismos analisados foram comparadas as frequências alélicas e genóticas entre os grupos Euro-Brasileiro e Afro-Brasileiro para determinar se há variação entre estes grupos étnicos. A comparação da frequência dos genótipos foi feita entre a frequência do genótipo homozigoto usual e a soma das frequências dos genótipos heterozigoto e homozigoto variante.

As frequências genóticas dos polimorfismos -429 T>C, -374 T>A, 63 Del e G82S encontradas estão distribuídas de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg nos dois grupos para todos os polimorfismos analisados ($P > 0,05$).

A Figura 8 mostra eletroforetograma em gel de agarose 1,5% típicos dos produtos de amplificação com tamanho de 344 bp do fragmento contendo o promotor e 397 bp do fragmento com o exon 3.

FIGURA 8 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES PROMOTORA E DO EXON 3 DO GENE RAGE.



Eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE 1X desenvolvida a 60V e 36 mA por uma hora. O DNA foi corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado sob luz ultravioleta (302nm). Imagem capturada pelo Sistema Biochemi (UVP). Linha 1: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Gibco). Linhas 2 a 5: perfil eletroforético do amplicon de 344 bp da região promotora do gene RAGE. Linhas 6 a 9: perfil eletroforético do amplicon de 397 bp da região do exon 3 de RAGE. À direita do gel estão os tamanhos obtidos após reação de PCR e à esquerda, os tamanhos do marcador de massa.

5.2.1 Análise da variabilidade da 63 Del

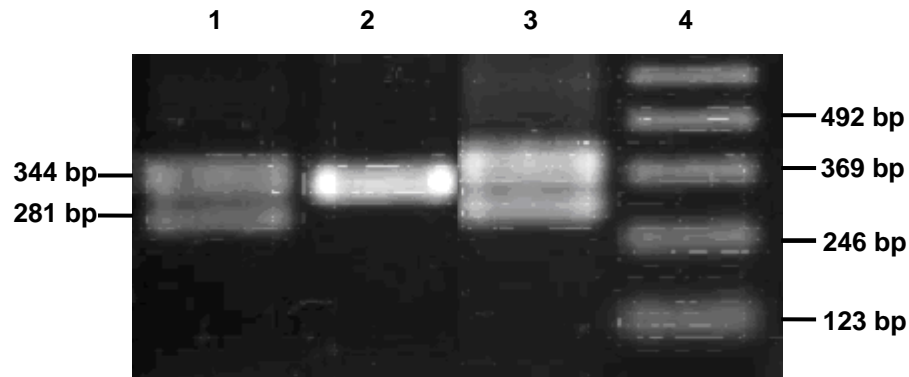
A 63 Del da região promotora de RAGE apresenta três genótipos identificáveis em gel de agarose 1,5 % após a reação de PCR: I/I, o homocigoto sem esta deleção, I/D, o heterocigoto que apresenta uma fita sem a deleção e a outra com a 63 Del, e D/D, o homocigoto com a 63 Del nas duas fitas; o último genótipo não foi encontrado em nenhuma amostra dos indivíduos analisados para ambos os grupos, Euro-Brasileiro e Afro-Brasileiro.

A análise dos géis de agarose 1,5% permitiu identificar, entre os indivíduos analisados, cinco amostras de Afro-Brasileiros com a 63 Del (Figura 9) na região promotora do gene RAGE em heterocigose, portanto, com o genótipo heterocigoto I/D. Nenhuma amostra apresentou a deleção em homocigose, bem como, não foi detectada nenhuma amostra de Euro-Brasileiro com a deleção.

A 63 Del gera perda do fragmento que inclui os nucleotídeos -405 a -345 da região promotora de RAGE na qual está localizado o polimorfismo -374 T>A, portanto, fitas com esta deleção não apresentam este polimorfismo. Para tanto, indivíduos com a 63 Del foram descartados das análises do polimorfismo -374 T>A, o que faz com que o grupo Afro-Brasileiro tenha, para este polimorfismo exclusivamente, 65

indivíduos contabilizados. Após a reação de restrição com a enzima *AluI*, pôde-se determinar que em todas as amostras com a 63 Del, a outra fita de DNA apresentava o alelo -374T.

FIGURA 9 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA 63 DEL DO AMPLICON DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.



Eletroforese em agarose 1,5% (tampão TBE 1X) dos produtos de amplificação da região promotora do gene RAGE identificados com brometo de etídeo e detectados em luz ultra-violeta (302 nm). Imagem capturada pelo Sistema Biochemi (UVP). Linhas 1 e 3: 63 Del em heterozigose com fita sem deleção; Linha 2: perfil sem deleção (344 bp) e; Linha 4: marcador de massa molecular de 123 bp. À esquerda do gel estão os tamanhos obtidos após reação de PCR e à direita, os tamanhos do marcador de massa.

A análise estatística da 63 Del revelou uma diferença significativa ($P = 0,034$) entre as freqüências dos alelos I e D nos grupos étnicos analisados neste estudo, visto que apenas o grupo de Afro-Brasileiros apresentou amostras com a 63 Del, enquanto no grupo Euro-Brasileiros não foi detectado nenhum indivíduo com deleção. A comparação entre as freqüências dos genótipos 63 Del I/I vs I/D+D/D apesar de considerada não significativa ($P > 0,05$), está próxima do limite de significância ($P = 0,06$) e, portanto, deve ser analisada cuidadosamente. A Tabela 9 resume estes resultados.

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA 63 DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.

GENÓTIPOS	TOTAL (N = 132)	EURO-BRASILEIROS (N = 62)	AFRO-BRASILEIROS (N = 70)	P ¹
I/I	127(96,2%)	62 (100%)	65 (92,9%)	
I/D	5 (3,8%)	0%	5 (7,1%)	
D/D	0 (0%)	0%	0%	0,060**
HW	P = 0,82	-----	P = 0,75	
D	0,019	0	0,036	
P² = 0,034*				

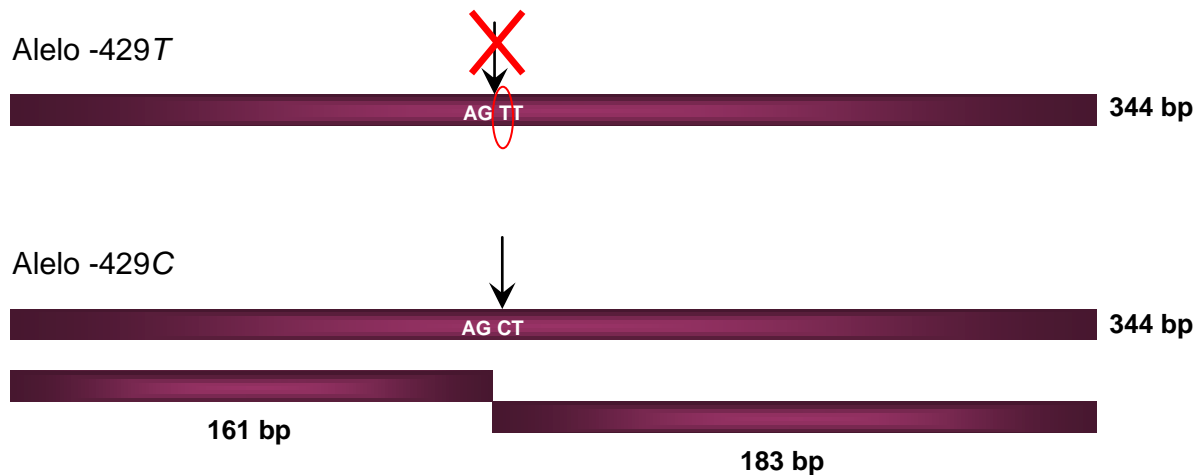
HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2); P: teste exato de Fisher bidirecional; P¹: 63 Del I/I vs I/D + D/D (teste exato de Fisher bidirecional); D: frequência do alelo D (63 Del); P²: comparação das frequências alélicas (teste de χ^2). Valores significativos sublinhados e em negrito. * O grupo Afro-Brasileiro apresentou frequência maior do alelo raro D que o Euro-Brasileiro (teste de χ^2 ; P² = 0,034). ** A comparação entre as frequências dos genótipos 63 Del I/I vs I/D+D/D, apesar de considerada não significativa (P¹ > 0,05), está no limite de significância.

5.2.2 Análise da variabilidade do polimorfismo -429 T>C

O uso da enzima *A1u1* permitiu identificar três genótipos do polimorfismo -429 T>C da região promotora de RAGE: T/T, o homozigoto usual, T/C, o heterozigoto, e C/C, o homozigoto variante; todos os três foram encontrados nas amostras dos dois grupos étnicos analisados, Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros.

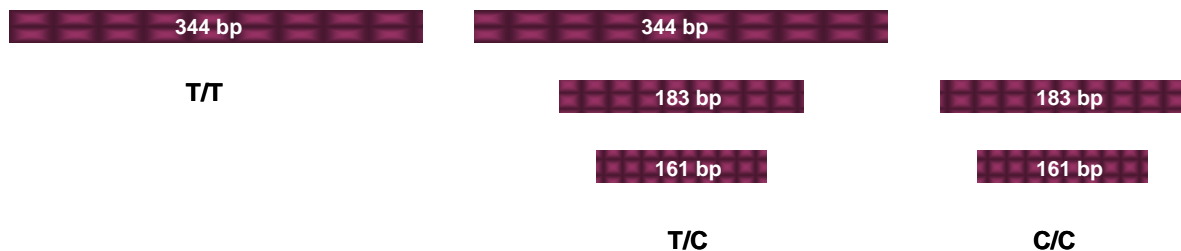
A Figura 10 esquematiza os sítios de restrição da enzima *A1u1* (que cliva o DNA no sítio **AG↓CT**) no amplicon de 344 bp do promotor, e os fragmentos de restrição que caracterizam os genótipos estão representados na Figura 11.

FIGURA 10 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE GERADO COM A ENZIMA *AluI*.



As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *AluI*. Em destaque a perda do sítio de restrição (X) na região do genótipo selvagem T/T.

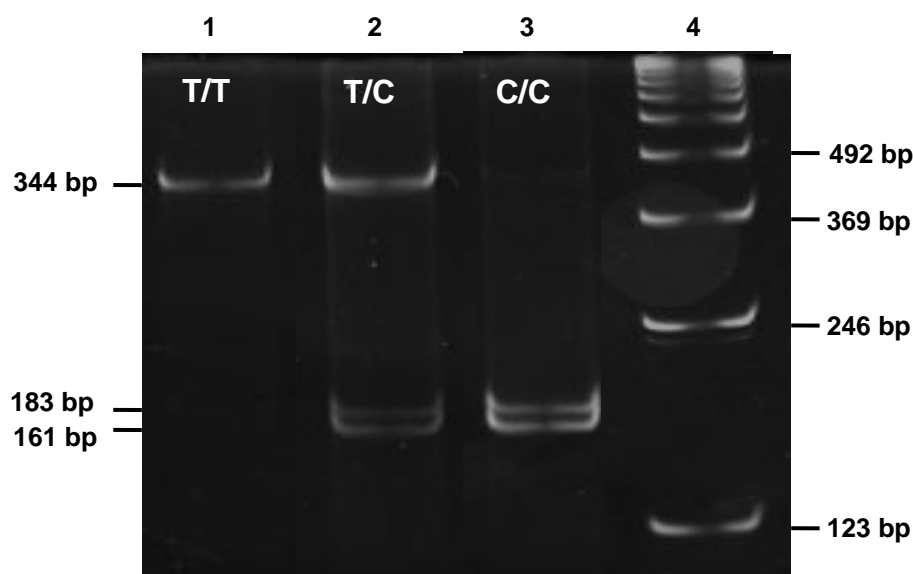
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.



A Figura 12 mostra o perfil eletroforético dos genótipos em gel de poliacrilamida 10% (29:1) após reação de PCR-RFLP, ou seja, após a digestão dos amplicons do promotor com a enzima *AluI*. A resolução das bandas permitiu evidenciar e diferenciar satisfatoriamente o padrão de bandas dos fragmentos digeridos.

O fragmento amplificado da região promotora de RAGE que possui o genótipo usual T/T (Linha 1) não apresenta o sítio de restrição de *AluI*, portanto, apresenta apenas uma banda de 344 bp após a restrição. A transição de timina para citosina na posição -429 da região promotora (AGCT) leva ao aparecimento de um sítio de restrição para *AluI*, gerando os fragmentos de 183 bp e 161 bp para o homocigoto C/C (Linha 3). Finalmente, o genótipo do heterocigoto T/C (Linha 2) apresenta os fragmentos de 344 bp, 183 bp e 161 bp.

FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -429 T>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: perfil eletroforético dos genótipos T/T, T/C e C/C, respectivamente. Linha 4: marcador de massa molecular de 123 bp. À esquerda do gel estão os tamanhos obtidos após reação de PCR-RFLP e à direita, estão os tamanhos do marcador de massa.

A Tabela 10 resume as freqüências genótípicas e alélicas encontradas para o polimorfismo -429 T>C da região promotora de RAGE. Não foram encontradas variações significativas ao comparar os dois grupos étnicos.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.

GENÓTIPOS	TOTAL (N = 132)	EURO-BRASILEIROS (N = 62)	AFRO-BRASILEIROS (N = 70)	P ¹
T/T	101 (76,5%)	47 (75,8%)	54 (77,2%)	1,000
T/C	29 (22,0%)	14 (22,6%)	15 (21,4%)	
C/C	2 (1,5%)	1 (1,6%)	1 (1,4%)	
HW	P = 0,96	P = 0,97	P = 0,97	
C	0,125	0,129	0,121	
P ² = 0,85				

HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2); P: teste exato de Fisher bidirecional; P¹: -429 T/T vs T/C+C/C (teste exato de Fisher bidirecional); C: freqüência do alelo C; P²: comparação das freqüências alélicas (teste de χ^2). Não foram observadas variações significativas para este polimorfismo.

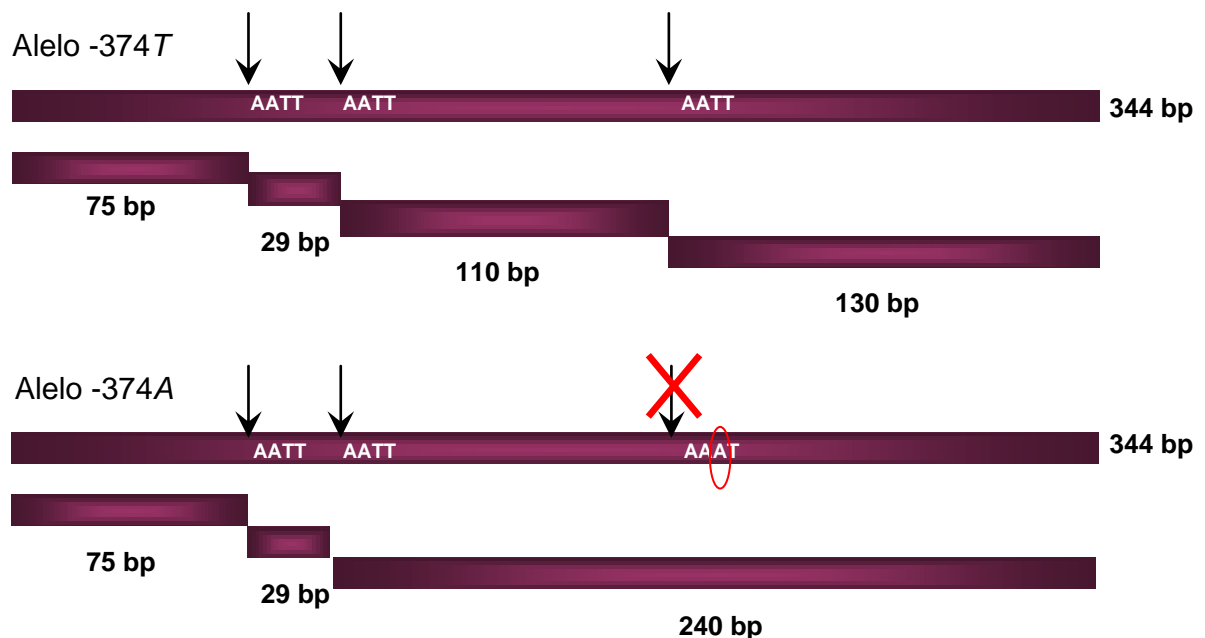
5.2.3 Análise da variabilidade do polimorfismo -374 T>A

O uso da enzima *Tsp509I* permitiu identificar três genótipos do polimorfismo -374 T>A da região promotora de RAGE: T/T, o homozigoto usual, T/A, o heterozigoto, e A/A, o homozigoto variante; todos os três foram encontrados nas amostras dos dois grupos étnicos analisados, Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros.

Como comentado anteriormente, o grupo Afro-Brasileiro apresentou cinco indivíduos com a 63 Del, que gera perda do fragmento que inclui o polimorfismo -374 T>A. Portanto, os indivíduos com a 63 Del foram retirados das análises do polimorfismo -374 T>A, o que faz com que, neste caso, o grupo Afro-Brasileiro apresente um total de 65 amostras investigadas, enquanto o grupo Euro-Brasileiro permanece com 62 amostras.

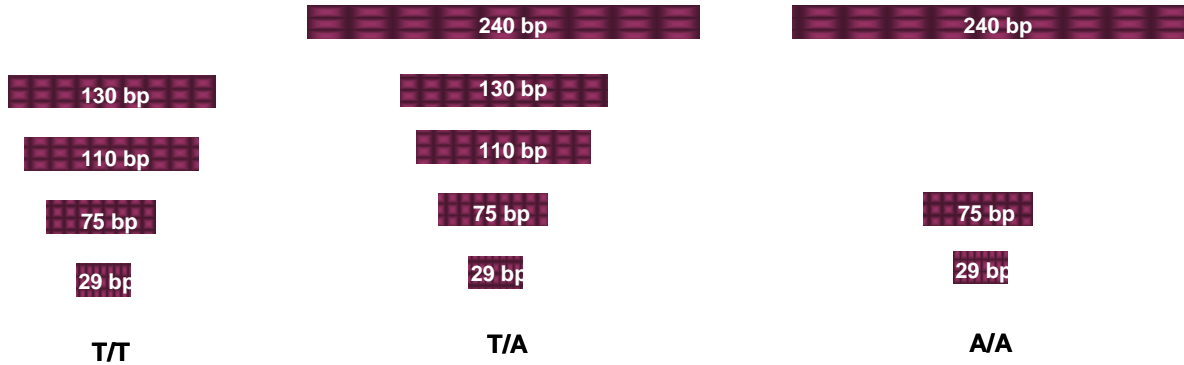
A Figura 13 esquematiza os sítios de restrição da enzima *Tsp509I* (que cliva o DNA no sítio ↓AATT) no amplicon de 344 bp da região promotora de RAGE e os fragmentos de restrição que caracterizam os genótipos estão representados na Figura 14.

FIGURA 13 – MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE COM A ENZIMA *Tsp509I*.



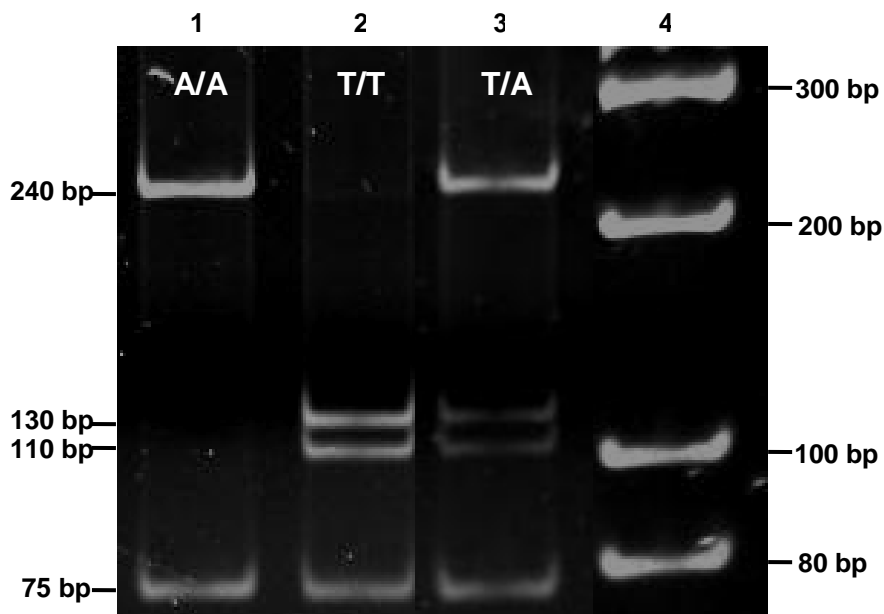
As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Tsp509I*. Em destaque a perda do sítio de restrição (X) na região da mutação -374A.

FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.



A Figura 15 mostra o perfil eletroforético dos genótipos em gel de poliacrilamida 10% (29:1) após reação de PCR-RFLP, ou seja, após a digestão dos amplicons do promotor com a enzima *Tsp509I*. A resolução das bandas permitiu evidenciar e diferenciar satisfatoriamente o padrão de bandas dos fragmentos digeridos.

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO -374 T>A 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: perfil eletroforético dos genótipos A/A, T/T e T/A, respectivamente. Linha 4: marcador de massa molecular de 100 bp. À esquerda do gel estão os tamanhos obtidos após reação de PCR-RFLP e à direita, os tamanhos do marcador de massa.

O fragmento amplificado que possui o genótipo homocigoto usual T/T (Linha 2) apresenta quatro fragmentos de restrição: 130 bp, 110 bp, 75 bp e 29 bp (o fragmento de 29 bp não está representado neste gel para nenhum genótipo devido a sua pequena massa molecular, embora esteja presente em todos, como representado na Figura 14). A mudança -374 T>A (AAAT), ou seja, a transversoão de timina para adenina, faz com que a enzima não reconheça a região como um sítio de restrição. Assim, o genótipo homocigoto variante A/A (Linha 1) não apresenta os fragmentos de 130 bp e 110 bp, mas sim um fragmento de 240 bp, que é a soma dos fragmentos de 130 bp e 110 bp, além dos fragmentos de 75 bp e 29 bp, comuns aos dois genótipos. O genótipo heterocigoto T/A (Linha 3) apresenta os dois alelos, portanto, apresenta todos os fragmentos: 240 bp, 130 bp, 110bp, 75bp e 29 bp.

A Tabela 11 resume as freqüências genotípicas e alélicas encontradas para o polimorfismo -374 T>A da região promotora de RAGE. O grupo Euro-Brasileiro apresentou a freqüência do genótipo T/T significativamente menor, e a freqüência de T/A+A/A significativamente maior que a de Afro-Brasileiros. Em relação às freqüências alélicas, o grupo Afro-Brasileiro apresentou freqüência significativamente menor do alelo raro -374A.

TABELA 11 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -374 T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.

GENÓTIPOS	TOTAL (N = 127)	EURO-BRASILEIROS (N = 62)	AFRO-BRASILEIROS (N = 65)	P ¹
T/T	63 (49,6%)	24 (38,7%)	39 (60,0%)	
T/A	55 (43,3%)	33 (53,2%)	22 (33,8%)	
A/A	9 (7,1%)	5 (8,1%)	4 (6,2%)	<u>0,021*</u>
HW	P = 0,52	P = 0,17	P = 0,71	
A	0,287	0,347	0,231	
P² = 0,041**				

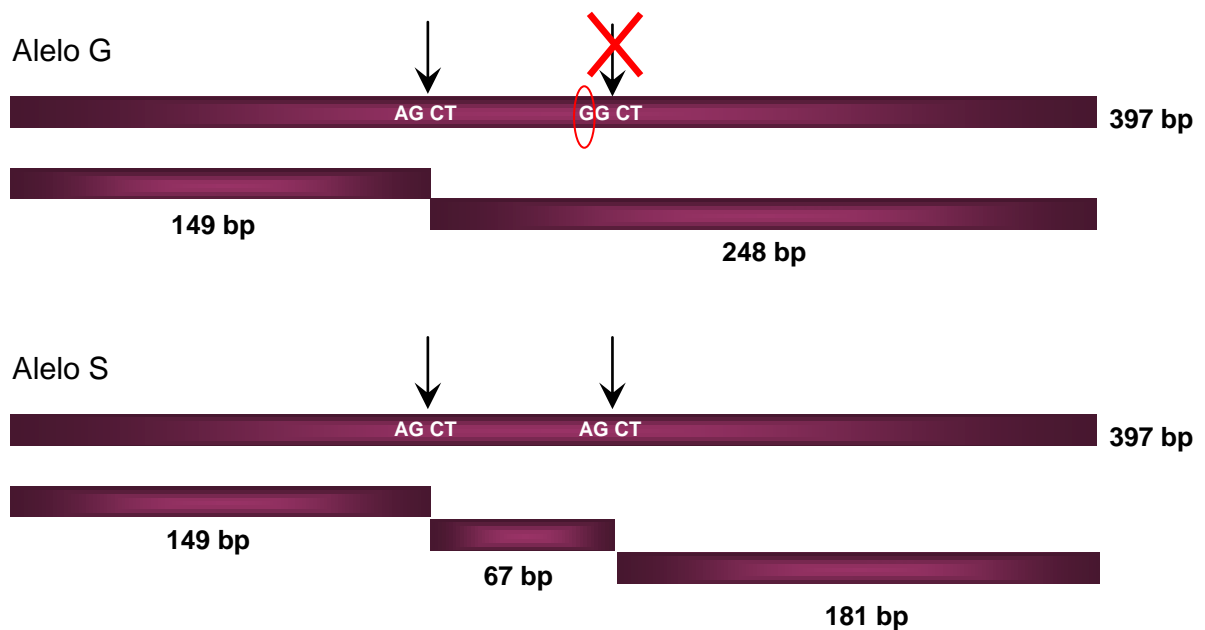
HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2); P: teste exato de Fisher bidirecional; P¹: -374 T/T vs T/A+A/A (teste exato de Fisher bidirecional); A: freqüência do alelo A; P²: comparação das freqüências alélicas (teste de χ^2). Valores significativos sublinhados e em negrito. * O grupo Euro-Brasileiro apresentou uma freqüência do genótipo T/T significativamente menor, e a freqüência de T/A+A/A significativamente maior que o grupo Afro-Brasileiro (teste exato de Fisher bidirecional; P¹ = 0,021). ** O grupo Afro-Brasileiro apresentou freqüência do alelo raro -374A significativamente menor que o grupo Euro-Brasileiro (teste de χ^2 ; P² = 0,041).

5.2.4 Análise da variabilidade do polimorfismo G82S

O uso da enzima *AclI* permitiu identificar dois dos três genótipos possíveis do polimorfismo G82S da região do exon 3 de RAGE: G/G, o homozigoto usual e G/S, o heterozigoto. O homozigoto variante S/S não foi encontrado nas amostras de nenhum dos dois grupos étnicos analisados, Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros.

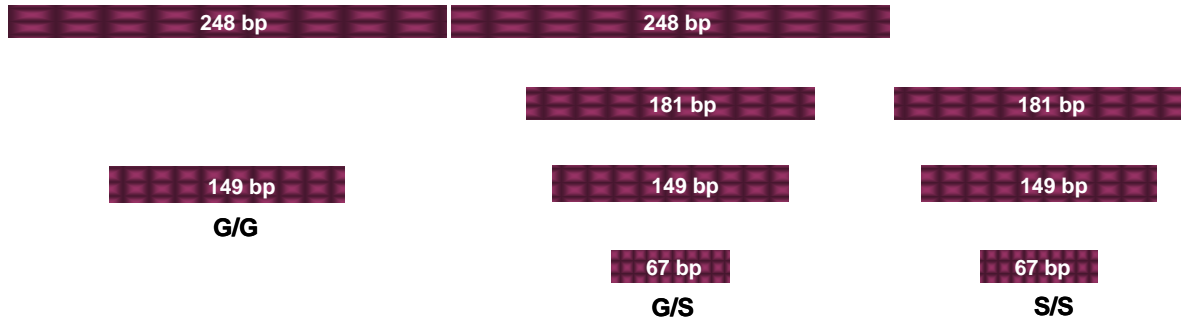
A Figura 16 esquematiza os sítios de restrição da enzima *AclI* (que cliva o DNA no sítio **AG↓CT**) no amplicon de 397 bp da região do exon 3 de RAGE e os fragmentos de restrição que caracterizam os genótipos estão representados na Figura 17.

FIGURA 16 - MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE GERADO COM A ENZIMA *AclI*.



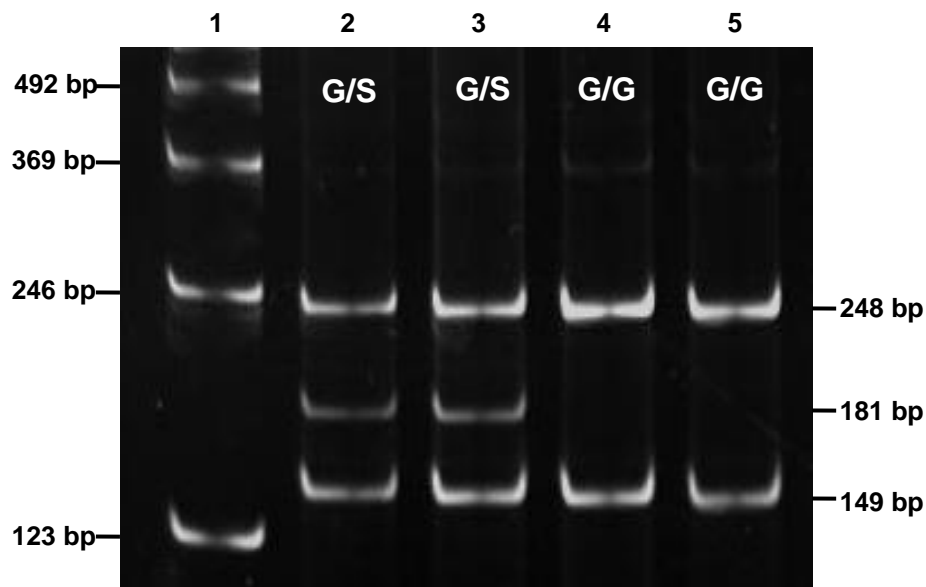
As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *AclI*. Em destaque a perda do sítio de restrição (X) na região do genótipo selvagem G/G.

FIGURA 17 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS PARA O POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE.



A Figura 18 mostra o perfil eletroforético dos genótipos em gel de poliacrilamida 10% (29:1) após reação de PCR-RFLP, ou seja, após a digestão dos amplicons do exon 3 com a enzima *AfuI*. A resolução das bandas permitiu evidenciar e diferenciar satisfatoriamente o padrão de bandas dos fragmentos digeridos.

FIGURA 18 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 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). Linha 1: marcador de massa molecular de 123 bp. Linhas 2 e 3: perfil eletroforético do genótipo G/S e, linhas 4 e 5: perfil eletroforético do genótipo G/G. À esquerda do gel pode-se observar os tamanhos do marcador de massa e à direita, estão os tamanhos obtidos após reação de PCR-RFLP.

O genótipo usual G/G apresenta uma guanina na posição 555 do exon 3 do gene RAGE, enquanto no alelo raro ocorre uma transição de guanina para adenina, causando uma substituição de aminoácidos (glicina por serina) no códon 82 da proteína resultante. Após a ação da *AluI* sobre o fragmento de PCR obtido são gerados dois fragmentos para o genótipo usual G/G (Linhas 4 e 5): 248 bp e 149 bp. O genótipo S/S (não encontrado neste estudo) apresenta um novo sítio de restrição no fragmento de 248 bp, produzindo os fragmentos: 181 bp e 67 bp, além do 149 bp. A restrição do heterozigoto G/S, Linhas 2 e 3, produz os fragmentos: 248 bp, 181 bp, 149 bp e 67 bp (esta última banda não está representada na foto, por ter massa molecular muito pequena).

A Tabela 12 resume as freqüências genótípicas e alélicas encontradas para o polimorfismo G82S da região promotora de RAGE. Não foram encontradas variações significativas ao comparar os dois grupos étnicos.

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO G82S DA REGIÃO DO EXON 3 DO GENE RAGE.

GENÓTIPOS	TOTAL (N = 132)	EURO-BRASILEIROS (N = 62)	AFRO-BRASILEIROS (N = 70)	P ¹
G/G	128 (97,0%)	59 (95,2%)	69 (98,6%)	
G/S	4 (3,0%)	3 (4,8%)	1 (1,4%)	
S/S	0	0	0	0,340
HW	P = 0,86	P = 0,84	P = 0,95	
S	0,015	0,024	0,007	
P ² = 0,257				

HW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2); P: teste exato de Fisher bidirecional; P¹: G82S G/G vs G/S+S/S (teste exato de Fisher bidirecional); S: freqüência do alelo S; P²: comparação das freqüências alélicas (teste de χ^2). Não foram observadas variações significativas para este polimorfismo.

5.3 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A

Para os polimorfismos -429 T>C e -374 T>A foi realizado um estudo de haplótipos e de desequilíbrio de ligação devido à sua proximidade.

Os dois alelos destes polimorfismos combinados podem formar até quatro tipos de haplótipos, sendo eles: -429T/-374T, -429T/-374A, -429C/-374T e -429C/-374A. Destes, três (-429T/-374T, -429T/-374A, -429C/-374T) foram encontrados

tanto em Euro-Brasileiros quanto em Afro-Brasileiros e suas freqüências são mostradas na Tabela 13. O haplótipo -429C/-374A, que contém os alelos raros dos polimorfismos -374 T>A e -429 T>C, não foi observado em nenhuma amostra.

Não foi encontrada diferença significativa das freqüências haplotípicas entre os grupos étnicos investigados com $P = 0,088$ (erro padrão S.E. = 0,007), indicando que os haplótipos se distribuem de forma similar nesta população.

TABELA 13 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS.

HAPLÓTIPOS ENCONTRADOS	EURO-BRASILEIROS	AFRO-BRASILEIROS
-429T/-374A	0,35	0,23
-429C/-374T	0,13	0,12
-429T/-374T	0,52	0,65

$P = 0,088$; S.E. = 0,007 (teste de χ^2).

A análise do desequilíbrio de ligação está sintetizada nas Tabelas 14 (Euro-Brasileiros) e 15 (Afro-Brasileiros). Corroborando os resultados da análise haplotípica, na qual não foi encontrado apenas o haplótipo com os alelos raros dos dois polimorfismos (-429C/-374A), o desequilíbrio de ligação encontrado para os dois grupos foi absoluto ($D' = 1$), o que indica que os alelos -429C e -374A não ocorrem na mesma fita de DNA, ou seja, quando ocorre o alelo raro -429C, nesta mesma fita ocorrerá o alelo mais comum do polimorfismo -374 T>A (-374T), e vice-versa.

TABELA 14 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A NO GRUPO DE EURO-BRASILEIROS.

	-374 T/T	-374 T/A	-374 A/A
-429 T/T	13	29	5
-429 T/C	10	4	0
-429 C/C	1	0	0

P = 0,0018; D' = 1.

TABELA 15 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A NO GRUPO DE AFRO-BRASILEIROS.

	-374 T/T	-374 T/A	-374 A/A
-429 T/T	26	20	4
-429 T/C	12	2	0
-429 C/C	1	0	0

P = 0,0193; D' = 1.

6. DISCUSSÃO

O receptor RAGE é capaz de reconhecer múltiplos ligantes e aparentemente está envolvido em um largo espectro de eventos fisiopatológicos. A função normal de RAGE ainda não está esclarecida. Entretanto sua ativação através da interação produtiva com um ligante desencadeia uma cadeia de transdução de sinal intracelular levando à resposta inflamatória, estado de pró-coagulação, geração de espécies reativas de oxigênio e inclusive modificação da expressão gênica com indução da transcrição do próprio gene RAGE. Sob condições anormais onde o RAGE é persistentemente ativado, como se presume ocorra em pacientes diabéticos, o RAGE funciona como um propagador de disfunções celulares (HUDSON et al., 2002; HUDSON et al., 2001; SCHMIDT et al., 2000).

A persistência de alta glicemia em paciente diabéticos, leva ao acúmulo de AGEs no organismo que resulta na alteração da matriz extracelular, alteração da estrutura e função de proteínas e, via ativação de RAGE, alteração na expressão de fatores de transcrição, desencadeando resposta inflamatória (SINGH et al., 2001). Estas últimas são respostas de caráter global que alteram a fisiologia celular e até tecidual. Assim, os efeitos decorrentes da resposta da ligação AGE-RAGE têm sido reportados como relevantes e favorecedores das complicações metabólicas e clínicas a que estão sujeitos os pacientes diabéticos.

Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) podem causar mudanças bioquímicas e fisiopatológicas importantes, resultando em modificação da seqüência de resíduos de aminoácidos na proteína ou no nível de expressão gênica. Os polimorfismos do gene RAGE têm sido relacionados com susceptibilidade genética às complicações do diabetes, além da possível associação com outras patologias, como a doença de Alzheimer. Por essas razões, muitos pesquisadores têm focado sua atenção em alguns polimorfismos do gene RAGE. Os polimorfismos analisados neste trabalho, -429 T>C e -374 T>A da região promotora, e G82S do exon 3. Outros polimorfismos que não constituem SNPs como a 63 Del da região promotora, têm sido associados com alterações importantes na expressão ou função de RAGE (HUDSON et al., 2002). Neste sentido é essencial conhecer as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos relevantes nas populações em estudo e, especialmente, a variação entre os diversos grupos étnicos, que quando não

consideradas podem levar a conclusões incorretas em estudos de associação com patologias.

O protocolo de PCR para amplificação do fragmento contendo a região promotora e do exon 3 do gene RAGE foi otimizado em nosso Laboratório e produziu grande quantidade do fragmento de DNA específico e nenhuma banda inespecífica. O procedimento eletroforético em agarose 1,5% para avaliar os produtos de PCR mostrou-se também adequado para identificar a presença da 63 Del da região promotora de RAGE de forma similar àquela descrita por outros autores (HUDSON et al., 2001; RUDOSFSKY et al., 2004).

Para a identificação dos polimorfismos -429 T>C, -374T>A e G82S, após reação de PCR-RFLP, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) para a separação dos fragmentos de restrição. Ao contrário de HUDSON et al. (2001) que utilizou eletroforese em gel de agarose a 3% para identificar os genótipos do polimorfismo -374 T>A. Embora o processo de eletroforese em gel de poliacrilamida seja mais trabalhoso, a separação dos fragmentos permitiu uma identificação inequívoca dos genótipos. Não foram observadas clivagem parcial ou aparecimento de bandas não esperadas na reação de PCR-RFLP.

No total foram analisados DNA de 132 indivíduos saudáveis, divididos em dois grupos fenotipicamente categorizados em Euro-Brasileiros (47%) e Afro-Brasileiros (53%). No grupo Euro-Brasileiro foi observada uma frequência significativamente maior de mulheres e menor de homens em relação ao Afro-Brasileiro, que apresentou idade média significativamente maior que o primeiro grupo. Estes dados são apenas para caracterizar a amostra, uma vez que o gene RAGE está em cromossomo autossômico, portanto sua herança não está ligada ao sexo. Assim variações significativas na composição de gêneros da amostra, não refletem variações nas frequências genóticas e alélicas de RAGE. A idade média poderia ser relevante no caso deste ser um estudo de associação com patologias; nosso estudo, no entanto, busca descrever as frequências de polimorfismos de RAGE em uma amostra da população brasileira saudável diferenciada etnicamente.

As frequências genóticas dos polimorfismos -429 T>C, -374 T>A, 63 Del e G82S se distribuíram de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg nos dois grupos para todos os polimorfismos analisados ($P > 0,05$), dado coincidente com o reportado para outras populações (FALCONE et al., 2005; FALCONE et al., 2004;

HUDSON et al., 1998; entre outros). As freqüências genóticas e alélicas dos polimorfismos -429 T>C e G82S se distribuíram de forma similar entre os grupos étnicos investigados. Em contraste, os Afro-Brasileiros apresentaram uma freqüência significativamente menor do alelo -374A em relação aos Euro-Brasileiros ($P = 0,041$). Adicionalmente, as freqüências dos genótipos do polimorfismo -374 T>A variaram significativamente entre os grupos: a freqüência do genótipo -374 T/T foi significativamente maior no grupo de Afro-Brasileiros e menor em Euro-Brasileiros, portanto, a freqüência dos genótipos combinados -374 T/A+A/A foi maior entre os Euro-Brasileiros.

KANKOVÁ et al. (2005) encontraram uma associação entre um haplótipo incluindo os alelos -429C/-374T com nefropatia em caucasóides diabéticos tipo 2. Na população estudada em nosso trabalho não foi encontrada qualquer variação significativa das freqüências dos haplótipos encontrados -429T/-374A; -429C/-374T; -429T/-374T entre os grupos étnicos investigados ($P = 0,088$), indicando que os haplótipos se distribuem de forma similar nesta população. Além disto, estes resultados são consistentes com o desequilíbrio de ligação absoluto encontrado entre os polimorfismos -429 T>C e -374 T>A ($D' = 1$) tanto para Euro-Brasileiros ($P = 0,0018$) quanto para Afro-Brasileiros ($P = 0,0193$). Portanto, os alelos -429C e -374A não ocorreram juntos em nenhum indivíduo dos dois grupos, visto que também não foi encontrada nenhuma amostra com haplótipo -429C/-374A, que contém os alelos raros destes polimorfismos. HUDSON et al. (2001), obtiveram dados similares aos nossos ($P < 0,0001$; $D' = 1$) ao estudar uma população de ingleses.

De acordo com KANKOVÁ et al. (2005), a ocorrência de um baixo desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos do promotor, -429 T>C e -374 T>A, e o do exon 3, G82S, aliada à baixa freqüência de G82S na população, sugere uma possível independência entre este polimorfismo e aqueles do promotor de RAGE. Por isso o polimorfismo G82S não foi incluído nas análises haplotípicas deste estudo, visto que assim como SNPs com forte ligação são associados de forma incorreta com patologias ao serem analisados separadamente, a análise haplotípica que inclui SNPs independentes pode gerar resultados equivocados (KANKOVÁ et al., 2005).

HUDSON et al. (1998) aventaram que devido à proximidade entre o gene RAGE e a região HLA é possível que qualquer associação encontrada entre RAGE e

complicações do diabetes seja devida a um desequilíbrio de ligação com variações nos loci de HLA. Entretanto, apesar de existir uma associação entre diabetes e variações nos *loci* HLA, ainda não há evidências que suportem esta associação com o desenvolvimento de complicações do diabetes (HUDSON et al., 1998).

Cinco indivíduos do grupo Afro-Brasileiro apresentaram o polimorfismo 63 Del em heterozigose, todos juntos com o alelo -374T. No grupo Euro-Brasileiro não foi detectado nenhum indivíduo com a 63 Del. A frequência do alelo 63Del é significativamente maior entre os Afro-Brasileiros ($P = 0,034$). Por outro lado, a comparação das frequências genóticas dos grupos não é estatisticamente significativa (genótipos I/I e I/D+D/D; $P = 0,060$), embora muito próxima do limiar de 5% de significância, sugerindo que estudos com populações maiores sejam realizados.

A Tabela 16 mostra uma comparação entre os resultados obtidos neste estudo para os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A, 63 Del e G82S, e os de outras populações, na maioria saudáveis, obtidos por outros autores.

HUDSON et al. (2001) estudaram uma população inglesa e encontraram uma associação entre o alelo -429C e retinopatia em diabéticos tipo 2. Ao comparar estatisticamente seus resultados com os nossos, constatou-se que os genótipos T/T e T/A+A/A, relativos ao polimorfismo -374 T>A, têm frequência em ingleses significativamente diferentes daquelas encontradas em Euro-Brasileiros deste estudo ($P = 0,0005$).

Em outro estudo, agora comparando a frequência de G82S entre populações caucasóides e asiáticas, HUDSON et al. (1998) concluíram que não havia diferenças de frequências entre as populações e que este polimorfismo não está associado a diabetes tipo 2 e suas complicações macrovasculares. Comparados com as frequências deste estudo, observa-se diferenças significativas entre o grupo Afro-Brasileiro e os caucasóides ($P = 0,004$) e os asiáticos ($P = 0,026$).

LIU e XIANC (1999) não encontraram associação da frequência do polimorfismo G82S com nefropatia e retinopatia em diabéticos tipo 2 numa população de chineses. A frequência dos genótipos deste polimorfismo do exon 3 diferiram significativamente tanto da do grupo de Euro-Brasileiros quanto daquela de Afro-Brasileiros encontradas neste estudo ($P < 0,00001$) e os chineses de LIU e XIANC (1999).

YOSHIOKA et al. (2005), buscando uma associação entre G82S e nefropatia em japoneses diabéticos tipo 2, obtiveram resultados negativos. As freqüências genotípicas de sua amostra diferem significativamente da de Euro-Brasileiros ($P = 0,0023$) e Afro-Brasileiros ($P < 0,00001$).

A freqüência dos genótipos relativos ao polimorfismo -374 T>A de Euro-Brasileiros ($P = 0,0182$) é significativamente diferente da de suíços (SCHENK et al., 2001), enquanto que a freqüência dos genótipos relativos aos polimorfismos -374 T>A ($P = 0,01$) e - 429 T>C ($P = 0,039$) de Afro-Brasileiros são significativamente diferentes das de uma população tcheca (KANKOVÁ et al., 2005).

As freqüências genotípicas relativas ao polimorfismo G82S foram similares ($P > 0,05$) às encontradas em brasileiros (NAKA et al., 2006), indianos (KUMARAMANICKAVEL et al., 2002) e tchecos (KANKOVÁ et al., 2005; VASKÚ et al., 2002). Além disso, as freqüências dos polimorfismos da região promotora -429 T>C, -374 T>A e 63 Del de Afro-Brasileiros e Euro-Brasileiros saudáveis foram semelhantes às de uma população de caucasóides e Afro-Brasileiros diabéticos tipo 2 (SANTOS et al., 2005), indicando que mesmo na presença da doença a freqüência genotípica se manteve similar entre populações de mesma etnia. A população de diabéticos tipo 2 estudada por SANTOS et al. (2005) foi utilizada nas análises comparativas mesmo não sendo uma população saudável, porque este foi o único trabalho encontrado na literatura reportando freqüências destes polimorfismos em Euro-Brasileiros (caucasóides) e Afro-Brasileiros.

A análise comparativa com outros dados reportados na literatura mostrou que as freqüências genotípicas dos Afro-Brasileiros em geral diferiram da de outras etnias, como caucasóides (suíços e tchecos) e asiáticos (chineses e japoneses). Embora em menor proporção, o grupo de Euro-Brasileiros também apresentou freqüências genotípicas diferentes das de outras populações caucasóides, fato que pode ser explicado pela grande miscigenação observada no Brasil devido ao seu contexto histórico e também pela origem diversa das populações chamadas caucasóides (Inglaterra, Eslovênia, Finlândia, China, Itália, República Tcheca, Suíça, e outros).

TABELA 16 – COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DE RAGE OBTIDOS NESTE TRABALHO COM OS REPORTADOS POR OUTROS AUTORES PARA DIFERENTES POPULAÇÕES.

REFERÊNCIA	POPULAÇÃO	N	-429 T>C		-374 T>A		63 Del		G82S	
			T/T	T/C+C/C	T/T	T/A+A/A	I/I	I/D+D/D	G/G	G/S+S/S
Presente estudo	Euro-Brasileira	62	47	15	24	38	62	0	59	3
	Afro-Brasileira	70*	54	16	39	26	65	5	69	1
HUDSON et al., 2001	Inglesa	113	75	38	75 ¹	38 ¹	---	---	---	---
HUDSON et al., 1998	Caucasóide	196	---	---	---	---	---	---	171 ²	25 ²
	Asiática	156	---	---	---	---	---	---	140 ³	16 ³
LIU e XIANC, 1999	Chinesa	104	---	---	---	---	---	---	59 ⁴	45 ⁴
NAKA et al., 2006	Brasileira	82	---	---	---	---	---	---	79	3
YOSHIOKA et al., 2005	Japonesa	232	---	---	---	---	---	---	183 ⁵	49 ⁵
SCHENK et al., 2001	Suíça	59	---	---	36 ⁶	23 ⁶	---	---	---	---
KUMARAMANICKAVEL et al., 2002	Asiática (índios)	50	---	---	---	---	---	---	59	3
VASKÚ et al., 2002	Tcheca	142	---	---	---	---	---	---	138	4
KANKOVÁ et al., 2005	Tcheca	228	125 ⁷	73 ⁷	82 ⁸	114 ⁸	---	---	193	6
SANTOS et al., 2005**	Caucasóide	520	402	118	256	264	502	18	---	---
	Afro-Brasileira	183	141	42	111	72	167	16	---	---

* Apenas 65 indivíduos contabilizados nas análises do polimorfismo -374 T>A. ** População com diabetes tipo 2, este trabalho foi considerado para as comparações por ser o único encontrado na literatura relatando frequências destes polimorfismos em Euro-Brasileiros (caucasóides) e Afro-Brasileiros. Valores significativamente diferentes (teste exato de Fisher bidirecional) dos encontrados neste trabalho estão marcados em negrito. ¹ Frequências dos genótipos T/T vs T/A+A/A de ingleses diferiram dos encontrados para Euro-Brasileiros em nosso estudo (P = 0,0005); ² Frequências dos genótipos G/G vs G/S+S/S de caucasóides diferiram dos de Afro-Brasileiros (P = 0,004); ³ Frequências dos genótipos G/G vs G/S+S/S de asiáticos diferiram dos de Afro-Brasileiros (P = 0,026); ⁴ Frequências dos genótipos G/G vs G/S+S/S de chineses diferiram dos de Euro-Brasileiros e de Afro-Brasileiros (P < 0,00001). ⁵ Frequências dos genótipos G/G vs G/S+S/S de japoneses diferiram dos de Euro- (P = 0,0023) e dos de Afro-Brasileiros (P < 0,00001); ⁶ Frequências dos genótipos T/T vs T/A+A/A de suíços diferiram dos encontrados para Euro-Brasileiros em nosso estudo (P = 0,0182); ⁷ Frequências dos genótipos T/T vs T/C+C/C de tchecos diferiram dos encontrados para Afro-Brasileiros em nosso estudo (P = 0,039); ⁸ Frequências dos genótipos T/T vs T/A+A/A de tchecos diferiram dos encontrados para Afro-Brasileiros (P = 0,01).

Uma limitação do nosso estudo foi o pequeno tamanho da amostra, que pode ter sido insuficiente para detectar indivíduos com alelos raros em homozigose, como a 63 Del e o alelo S do polimorfismo G82S, subestimando ou superestimando as freqüências reais dos mesmos na população. Portanto, apesar dos resultados serem consistentes quando comparados com os da literatura, novos estudos com uma amostra maior e melhor caracterizada devem ser realizados para confirmar as freqüências encontradas para esses polimorfismos em uma população Brasileira saudável.

Para HUDSON et al. (2002), é muito provável que a interação entre RAGE e seus ligantes, como os AGEs, se apresente como novo alvo para intervenção com drogas para reduzir ou prevenir o desenvolvimento de efeitos debilitantes da hiperglicemia. Juntamente com resultados de susceptibilidade genética das variantes alélicas de RAGE que podem influenciar na progressão posterior da doença, o tratamento personalizado pode ser uma possibilidade para minimizar a progressão da doença.

7. CONCLUSÕES

- Todas as frequências genóticas seguem o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$);
- As frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos -429 T>C e G82S foram similares entre os grupos de Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros saudáveis;
- Os Afro-Brasileiros deste estudo apresentaram uma frequência significativamente menor do alelo -374A em relação aos Euro-Brasileiros ($P = 0,041$, teste de χ^2);
- A frequência do genótipo -374 T/T foi significativamente maior no grupo de Afro-Brasileiros, enquanto a frequência dos genótipos combinados -374 T/A+A/A foi maior entre os Euro-Brasileiros;
- As frequências dos haplótipos encontrados (-429T/-374A; -429C/-374T; -429T/-374T) se distribuiu de forma similar entre os grupos étnicos investigados ($P = 0,088$);
- Foi encontrado desequilíbrio de ligação absoluto entre os polimorfismos -429 T>C e -374 T>A ($D' = 1$) tanto para Euro-Brasileiros ($P = 0,0018$) quanto para Afro-Brasileiros ($P = 0,0193$);
- Cinco indivíduos do grupo de Afro-Brasileiros (7,1%) apresentaram a 63 Del na região promotora de RAGE em heterozigose com o alelo -374T, no entanto, nenhuma amostra de Euro-Brasileiro apresentou a 63 Del;
- A frequência alélica da 63 Del foi significativamente maior em Afro-Brasileiros ($P = 0,034$; teste de χ^2);
- Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) das frequências genóticas (I/I vs I/D+D/D) da 63 Del entre os grupos étnicos;
- Nossos resultados foram similares ($P > 0,05$, teste exato de Fisher bidirecional) aos encontrados para o G82S em brasileiros, índios asiáticos e tchecos; bem como aos encontrados para os polimorfismos da região promotora -429 T>C, -374 T>A e 63 Del em uma população de diabéticos tipo 2 de caucasóides e Afro-Brasileiros;

- As frequências genóticas de Afro-Brasileiros, em geral, diferiram de outras populações caucasóides (suíços e tchecos) e asiáticas (chineses e japoneses). As frequências genóticas de Euro-Brasileiros foram mais concordantes com as de outras populações caucasóides, mas algumas diferenças estatisticamente significativas foram observadas;
- Esta é a primeira descrição da frequência desses polimorfismos em uma população Brasileira saudável.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. U., THORPE, S. R. AND BAYNES, J. W., **J. Biol. Chem.**, 261, 4889–4894, 1986.
- ARAKI, N.; et al., **Eur. J. Biochem.**, 230, p. 408–415, 1995.
- 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 glucosylation. **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.

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.E.; 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 Number D28769.

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.

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

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

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

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.

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.

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.

KUNIASU, 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.

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.

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-STRIHO, 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, número 3, 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., **Carbohydr. Res**, 167, 211–220, 1987.

O'BRIEN, K.D. et al., **ibid**, 92, p. 945–951, 1993.

OHGAMI, N. et al., **ibid**, 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.

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. **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.

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

SANTOS, K.G.; CANANI, L.H.; GROSS, J.L.; TSCHIEDEL, B.; PIRES SOUTO, K.L.; 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. **Molecular Genetics and Metabolism**, 85: 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.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; STERN, D.M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **The Journal of Clinical Investigation**, 108, p. 949-955, 2001.

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.; YAN, S.D.; STERN, D.M. **Circulation**, 96, 194, 1997.

SCHMIDT, A.M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S.D.; WAUTIER, J.L.; STERN, D.; **Arterioscler. Thromb.**, 14, p. 1521–1528, 1994.

SCHMIDT, A.M.; YAN, S. D.; BRETT, J.; MORA, R., NOWYGRAD, R.; STERN, D., **ibid**, 91, p. 2155–2168, 1993.

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. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 53, 438-447, 1994.

SELL, D.R.; MONNIER, V.M., **J. Biol. Chem.**, 264, 21597–21602, 1989.

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.

SUZUKI, H. et al., **Nature**, 386, p. 292–296, 1997.

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.

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.

400 bp

VLIASSARA, 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. Protein Chem.**, 14, p. 359–372, 1995.

YAMAGISHI, S. et al., **Biochem. Biophys. Res. Commun.**,213, p. 681–687, 1995.

YANG, Z.; MAKITA, Z.; HORII, Y.; BRUNELLE, S.; CERAMI, A.; SCHAJPAL, P.; SUTHANTHIRAN, M. e VLIASSARA, H. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation 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 e G82S polymorphisms of RAGE gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients. **Metabolism Clinical and Experimental**, 54, p. 488-491, 2005.