

MÁRCIA HEIDEMANN

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS VARIAÇÕES
GENÉTICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
DO RECEPTOR PARA PRODUTOS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA (RAGE)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Curitiba

2008

Dedicado à

Murilo

Marcelo

Delmiro

Cláudia

Celina

João Carlos

***Que Deus nos dê sabedoria para descobrir
o certo, vontade para escolhê-lo e força
para fazê-lo durar.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação, apoio, compreensão e ensinamentos, fundamentais para o desenvolvimento desse projeto e para minha formação.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa, pela oportunidade de desenvolvimento desse projeto.

Ao professor Geraldo Picheth pela imensa colaboração nesse projeto, sugestões, discussões, auxílio, incentivo, enfim, por toda a dedicação prestada meu eterno agradecimento.

Aos professores do núcleo de fixação de nitrogênio, em especial ao professor Leonardo Cruz pelo auxílio nas análises de bioinformática.

À professora Roseli Wassem, pela atenção e sugestões que foram muito importantes para o êxito desse projeto.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiram a realização desse projeto.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À dona Ju, Roseli e Valter pela ajuda e carinho demonstrados.

Aos amigos de laboratório André Luiz, Ju Osaki, Giovana, Pati, Lizi, em especial ao pessoal da 275, Ana C, Ju Inaba, Gus, e Michelle pela preocupação, apoio, amizade e por todo tipo de auxílio durante o mestrado em especial ao período de minha gravidez.

Aos amigos da turma mestrado, Alexandre, Danilo, Fer, Fernandinha, Gláucio, João, Lúcia, Vivi, Lari Comarela, Larissa Toneli, Marco Antônio, Michele, Rafael, Thaís e aos colegas Dayane e Doumit, pelo companheirismo, carinho, e ótimos momentos de convivência.

Aos meus queridos pais pelo apoio, incentivo, carinho, ajuda e por serem meu porto seguro. Obrigada por tudo, vocês são muitos especiais em minha vida.

Aos meus irmãos queridos, Celina e João Carlos pelo carinho e atenção que sempre me dedicaram, sem vocês minha vida não seria completa.

Aos meus queridos avós (*in memoriam*) Terezinha e João pelo amor, preocupação e tantas orações que fizeram por mim.

À minha sogra Orides pela sempre colaboração e a todos meus familiares que acreditam e torcem por meu sucesso.

Ao meu amado esposo Marcelo, pelo apoio e incentivo aos estudos, e pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao Murilo, pelo sorriso encantador que é a razão da minha vida.

A todas as pessoas que, mesmo não mencionadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

E finalmente, porém de maior importância, agradeço a Deus que tem abençoado a minha vida com tantas oportunidades e pessoas maravilhosas ao meu lado.

RESUMO

O receptor para os produtos de glicação avançada (RAGE) é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas. RAGE é um multiligante, sendo os produtos finais de glicação avançada (AGEs) os principais ligantes. A interação AGE-RAGE promove uma série de respostas celulares envolvidas principalmente nos processos inflamatórios e complicações associadas ao *Diabetes mellitus* e a doença arterial coronariana (DAC). Vários polimorfismos para o gene RAGE estão descritos e entre estes os da região promotora, -429T>C, -374T>A, e a deleção de 63pb (-407_-345del), mostraram-se funcionais, aumentando a transcrição do gene. Neste trabalho procuramos variações genéticas na região promotora (-738 a +49pb) do gene RAGE em 97 indivíduos utilizando a técnica de sequenciamento de DNA. A amostra foi composta por Euro-Brasileiros (95%) apresentando *Diabetes mellitus* tipo 2 com DAC (DM2+DAC+), doença arterial coronariana (DAC+) e um grupo controle (ausência de diabetes e DAC). Foram identificadas na amostra total as variações genéticas (frequências dos alelos raros): +20T>A (A=11,6%), -242A>T (T=3,1%), -374T>A (A=35,1%), 63del (del 2,1%), -429T>C (C=19,8%) e -505_-504delTT (0,5%). As frequências alélicas respeitam o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos, exceto para a 63del. Dois novos polimorfismos foram encontrados, ambos próximos a sítios reconhecidamente funcionais, -242A>T (no sítio regulatório NF-IL6) e o -505_-504delTT (próximo ao sítio -429). Sugerimos que esses novos polimorfismos também podem interferir na expressão do gene RAGE. As frequências genotípicas e alélicas dos novos polimorfismos de RAGE são baixas indicando, se funcionais, um efeito populacional pequeno.

ABSTRACT

The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a member of the immunoglobulin super family. RAGE activation, especially by advanced glycation end products (AGEs), is involved in inflammatory processes, and it has been associated with diabetes complications and cardiovascular disease. Several RAGE gene polymorphisms were described. The promoter region polymorphisms -429T>C, -374T>A and a 63bp deletion (-407_-345del) confer increased RAGE gene expression. The aim of this study was to seek new genetic variations of the RAGE promoter region (-738 to +49bp) using DNA sequencing. The population sampled (n=97) was composed by 95% Euro-Brazilians subjects with type 2 diabetes and cardiovascular disease (CAD), as judged by coronary angiography, and a control group (absence of diabetes and CAD). Six polymorphisms were identified (rare allele frequencies): +20T>A (A=11.6%), -242A>T (T=3.1%), -374T>A (A=35.1%), 63del (del 2.1%), -429T>C (C=19.8%) and -505_-504delTT (0.5%). All the allele frequencies were in agreement of Hardy-Weinberg equilibrium, but 63del. Two new polymorphisms were found: -242A>T (in the regulatory site of NF-IL6, CCAAT-enhancer-binding protein) and -505_-504delTT. We hypothesize that these new polymorphisms may be involved in altered RAGE expression. The genotype and allele frequencies of the new polymorphisms are low, indicating that, if they are functional, a lower population effect is expected.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- FORMAÇÃO DOS AGEs	12
FIGURA 2	- REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DO AGE COM O DOMÍNIO V DE RAGE ...	14
FIGURA 3	- ESQUEMA DO RECEPTOR RAGE E SUAS VARIANTES.....	16
FIGURA 4	- SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	18
FIGURA 5	- POLIMORFISMOS MAIS FREQUENTES DO GENE RAGE.....	20
FIGURA 6	- PRINCIPAIS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO AGE-RAGE	21
FIGURA 7	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -285 A +49 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA +20A>T.....	40
FIGURA 8	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -285 A +49 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -242A>T.....	41
FIGURA 9	- ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -285 A +49 DE ALGUMAS AMOSTRAS EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA +20 A>T	42
FIGURA 10	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -429 T>C	44
FIGURA 11	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -374 T>A.....	45
FIGURA 12	- ALINHAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -738 A -246 EVIDENCIANDO A DELEÇÃO DE 63PB EM HOMOZIGOSE.....	46
FIGURA 13	- PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE HETRODUPLEX DE PARTE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE	47
FIGURA 14	- ALINHAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -738 A -246 DA AMOSTRA EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -505_-504delTT.....	48
FIGURA 15	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -505_-504delTT	49
FIGURA 16	- ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EXEMPLIFICANDO UM RESULTADO INCONCLUSIVO.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS DO GENE RAGE.....	19
TABELA 2 - CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA.....	26
TABELA 3 - CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE PARTE DA REGIÃO DO PROMOTOR DO GENE RAGE	28
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA.....	35
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA VARIAÇÕES NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	52
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA VARIAÇÕES GENÉTICAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	53
TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA VARIAÇÕES GENÉTICAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Produtos finais de Glicação Avançada; <i>Advanced Glycation End Products</i>
AGER	Receptor para Produtos de Glicação Avançada – sinônimo de RAGE
CTRL	Grupo controle, apresentando ausência de DM2 e DAC
DAC	Doença arterial coronariana
DAC+	Grupo positivo para doença arterial coronariana
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DM2+DAC+	Grupo apresentando DM2 associado a DAC
ddNTP	dideoxynucleotídeos trifosfato
E2	17 β - estradiol
F	<i>forward</i>
HbA1C	Hemoglobina Glicada A1C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	HDL- Colesterol
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NF-IL6	fator de transcrição nuclear IL-6
NF-κB	fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
Nt RAGE	forma truncada de RAGE na região N terminal
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R	reverso
RAGE	Receptor para Produtos de Glicação Avançada, <i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>
RFLP	Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição; <i>restriction fragment-length polymorphism</i>
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo; <i>single nucleotide polymorphism</i>
sRAGE	RAGE solúvel. Isoformas de RAGE que não têm a porção transmembrana sendo secretadas no plasma
SSCP	Polimorfismo de Conformação de Fita Simples, <i>single-strand conformation polymorphism</i>
TNFα	fator α de necrose tumoral
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
UTR	região não traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGES).....	11
1.2 Receptores para os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGES)	13
1.3 RAGE (Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada)	14
1.3.1 O gene RAGE.....	17
1.4 Interação RAGE-AGE	21
1.5 Associação de AGES, RAGE e <i>Diabetes mellitus</i>	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Amostra	25
3.2 Extração do DNA genômico	26
3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
3.4 Sequenciamento dos produtos de PCR	29
3.4.1 Preparo do DNA amplificado para sequenciamento	29
3.4.2 Reação de sequenciamento.....	29
3.4.3 Purificação da reação de sequenciamento	30
3.5 Análise de bioinformática	30
3.5.1 Montagem das seqüências contíguas	30
3.6 Análises Estatísticas	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Amostra	35
4.2 Análise do sequenciamento de DNA	36
4.2.1 Sequenciamento da região de -285 a +49	39
4.2.2 Sequenciamento da região de -738 a -246	43
4.2.3 Resultados inconclusivos	50
4.3 Comparações entre as freqüências genótípicas e alélicas para a região promotora do gene RAGE em estudo.....	51
5. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	65
Apêndice 1: Descrição da hierarquia dos diretórios criada para a montagem das seqüências, exemplificada pela amostra 153.....	66
Apêndice 2: Visualização gráfica com o programa CONSED da montagem das seqüências exemplificada pela amostra 153.....	67

1. INTRODUÇÃO

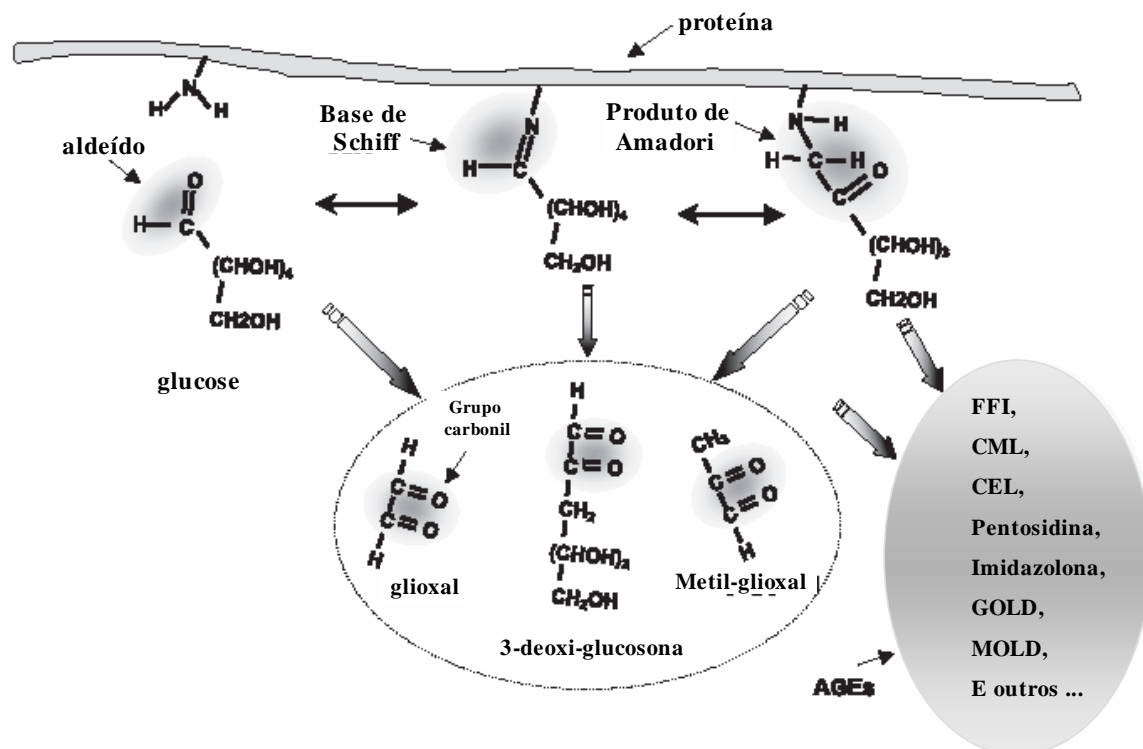
1.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

Os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) são formados pela reação entre açúcares e grupos amino livres de muitas moléculas, principalmente de proteínas. Estes compostos parecem ter um papel central em diversas patologias relacionadas com o *Diabetes mellitus* (BROWNLEE *et al.*, 1995; NISHIKAWA, *et al.*, 2000). Esta reação foi primeiramente descrita por Maillard em 1912 e consiste em uma cascata extremamente complexa de reações lentas, que podem demorar semanas ou meses, envolvendo condensações, rearranjos, modificações oxidativas até atingirem o estágio irreversível de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (NAGARAJ *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 2001; LAPOLLA *et al.*, 2005).

Ainda não é completamente conhecido o processo de formação dos AGEs, uma vez que estes produtos podem ser gerados por múltiplas reações. Uma das vias caracterizadas, a reação de Maillard, pode ser subdividida em três etapas principais: (1) formação da base reversível de Schiff e produtos de Amadori estáveis, (2) rearranjos destes compostos em estruturas químicas mais complexas e reativas e, finalmente, (3) formação dos produtos de glicação avançada (AGEs), que são acumulados em proteínas de longa vida (BASTA *et al.*, 2004; LAPOLLA *et al.*, 2005). A figura 1 mostra as principais reações de formação dos AGEs.

Os AGEs mais representativos são: N ϵ -carboximetil-lisina (CML), de maior concentração no soro, pentosidina, 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosilpirrol (AFGP), 2-(2-fluoril)-4,5-furanil-1-H-imidazol (FFI) e pirralina (SCHLEICHER *et al.*, 2001).

FIGURA 1 – FORMAÇÃO DOS AGEs



Possíveis caminhos na formação dos AGEs. Grupos aldeídos altamente reativos de açúcares como a glucose, reagem com grupos amino livres principalmente de proteínas formando a base de Schiff, que se rearranjam formando os produtos de Amadori. Subseqüente, mudanças mais lentas são progressivamente menos reversíveis até finalmente levarem a formação dos AGEs. Em adição, uma variedade de intermediários carbonil altamente reativos semelhante a 3-deoxi-glucosona, glioxal e metil-glioxal podem ser formados pela auto oxidação da glucose, ou base de Schiff, ou produto de Amadori, que podem reagir novamente com grupo amino livres para formar AGEs como a imidazolona, N ϵ -carboxi-metil-lisina (CML), N ϵ -carboxi-etil-lisina (CEL), dímero glioxal-lisina (GOLD) e dímero metil-glioxal-lisina (MOLD).

FONTE: BASTA *et al.*, 2004.

Dentre os vários efeitos tóxicos produzidos pelos AGEs estão: (1) a formação de ligações cruzadas entre as proteínas na matriz extracelular levando a um eventual estreitamento do lúmen vascular, (2) formação dos AGEs intracelularmente envolvendo intermediários do metabolismo da glucose, alterando a estrutura e função de proteínas, e (3) interação de AGEs com receptores podendo ativar vias pró-inflamatórias e coagulantes (BROWNLEE *et al.*, 1995; HUDSON *et al.*, 2002; LAPOLLA *et al.*, 2005).

O efeito mais conhecido dos AGEs é a sua capacidade de realizar ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas e este pode ser o principal processo pelo qual estes produtos causam danos (NAGARAJ *et al.*, 1996; MIYATA *et al.*, 1997). A formação de ligações cruzadas induzidas por AGE leva a mudança das proteínas

afetadas, impedindo sua função, bem como aumentando a resistência à remoção proteolítica, afetando o processo de remodelagem dos tecidos, em especial do colágeno presente na parede dos vasos sanguíneos. A parede vascular tem sua estrutura alterada ao longo do tempo o que afeta a sua permeabilidade. Estas mudanças ocorrem com o avanço da idade e são aceleradas no diabetes (NISHIKAWA *et al.*, 2000).

Imunoglobulinas presentes no lúmen extracelular podem se ligar ao colágeno glicado perdendo sua função imunológica. Lipoproteína de baixa densidade (LDL) também pode se ligar ao colágeno glicado, alterando a composição dos vasos e contribuindo para a oclusão vascular (WANG *et al.*, 1998). As reações de glicação não ocorrem somente com proteínas, mas também podem ocorrer, por exemplo, com fosfolipídios do LDL levando a alterações funcionais e a uma maior susceptibilidade a modificações oxidativas. O LDL glicado não é reconhecido pelo seu receptor, mas por receptores que permitem a sua endocitose culminando em um processo que estimula a síntese de colesterol nas células. Além disso, a glicação do LDL pode levar à formação de radicais livres e, desta forma, contribuir para o estado de estresse oxidativo celular (WANG *et al.*, 1998; LAPOLLA *et al.*, 2005).

Os AGEs podem estar relacionados com diversas patologias. Estudos têm mostrado o acúmulo de AGEs em tecidos como córtex renal e membrana basal glomerular em nefropatia, artéria coronária em doença arterial coronariana, e ainda em placas amilóides na doença de Alzheimer, cartilagem em artrite reumatóide, músculo cardíaco, pulmão e fígado (SINGH *et al.*, 2001).

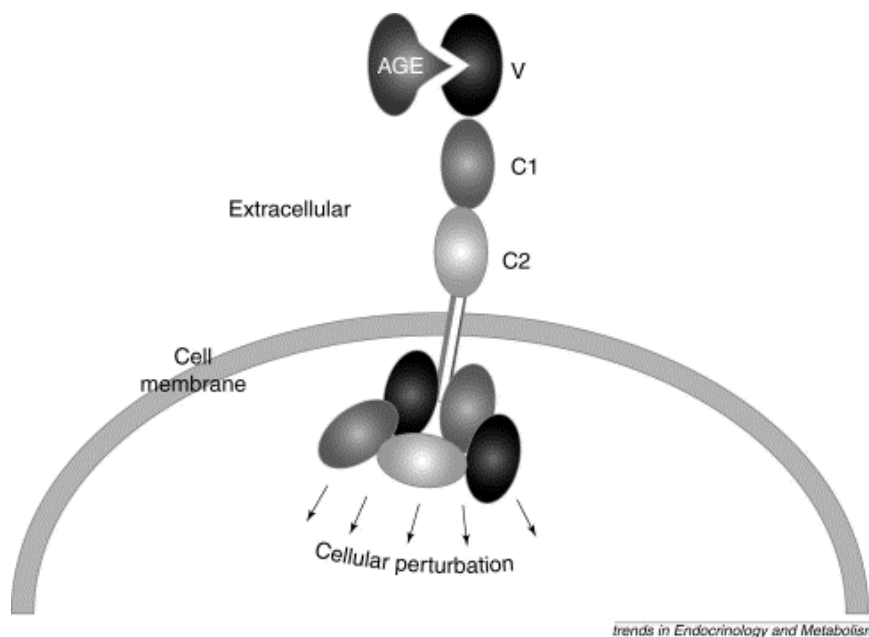
1.2 Receptores para os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

Vários receptores celulares que apresentam capacidade de ligação com os AGEs foram identificados como, por exemplo, os receptores tipo I e II encontrados na superfície de macrófagos (*scavenger*), galectina-3, OST-48, 80K-H, CD36 e RAGE (receptor de produtos finais de glicação avançada) (SINGH *et al.*, 2001; HUDSON, *et al.*, 2002). Entre eles, o RAGE é o mais estudado, pois é o único provável transdutor de sinais (VLASSARA *et al.*, 1995; POIRIER *et al.*, 2001 e MIYAZAKI *et al.*, 2002; KANKOVÁ *et al.*, 2005).

1.3 RAGE (Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada)

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE ou AGER) é uma proteína de aproximadamente 45 kDa. É um membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular. Possui três domínios: um tipo V (variável) e dois tipo C (constante). Além destes domínios, o RAGE possui uma região transmembrana de ancoragem que fixa o RAGE na membrana e uma pequena e altamente carregada cauda citosólica com 43 aminoácidos que são necessários para a sinalização intracelular (figura 2) (SCHMIDT e STERN, 2000).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO DO AGE COM O DOMÍNIO V DE RAGE



O domínio extracelular do RAGE é formado por um tipo de domínio V seguido por duas regiões do tipo C (C1 e C2). Um único domínio transmembrana de ancoragem fixa o RAGE na membrana e uma pequena, altamente carregada cauda citosólica media a interação com as moléculas sinalizadoras de transdução citosólicas.

FONTE: SCHMIDT e STERN, 2000.

Há 3 formas bem caracterizadas da proteína RAGE resultante de *splicing* alternativo, a forma RAGE *full-length*, proteína completa com 45 kDa descrita anteriormente, a forma C-truncada de RAGE e a forma N-truncada (YONEKURA *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2005), embora estudos demonstrem a existência de inúmeros *splicing* variantes em diferentes tecidos (HUDSON *et al.*, 2007).

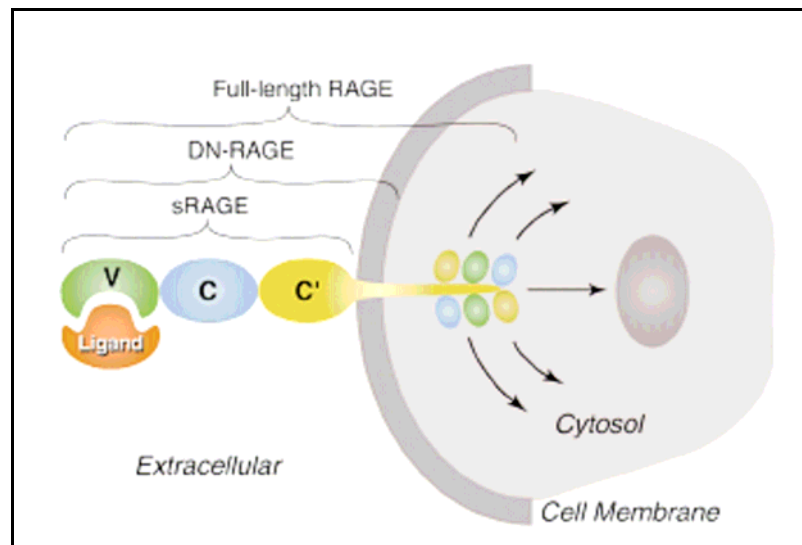
A forma C-truncada de RAGE tem 35 kDa e é secretada. Esta forma é o chamado RAGE solúvel (sRAGE) que conserva parte do intron 9 o qual introduz um códon de parada, eliminando as regiões codificadas pelos exons 10 e 11, que correspondem a hélice transmembrana e à cauda citosólica, resultando numa forma livre de RAGE (SCHMIDT *et al.*, 2000; YONEKURA *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2005). A proteína sRAGE é uma provável supressora da ativação e sinalização de RAGE, visto que seqüestra seus ligantes mas impede a transdução de sinal, evitando dessa forma os efeitos da interação ligante-RAGE (DING *et al.*, 2005). HUDSON *et al.*, 2006a sugerem a formação de sRAGE como um mecanismo endógeno de proteção contra o câncer.

A terceira forma é truncada na região N terminal (Nt RAGE). Isto ocorre porque o mRNA desta forma conserva o intron 1 que contém um códon de parada, resultando na perda do exon 1 e 2 além de parte do exon 3. A forma N-truncada não contém o domínio imunoglobulina tipo V, ocasionando uma diminuição da capacidade de ligar os ligantes de RAGE (YONEKURA *et al.*, 2003; DING *et al.*, 2005).

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), além de outras formas não tão bem caracterizadas. A Figura 3 mostra algumas formas da proteína RAGE.

Hudson *et al.* (2006b) analisaram o *splicing* alternativo do gene RAGE em humanos e em ratos e observaram menos formas alternativas da proteína em ratos e que há uma conservação das regiões de *splicing*, porém há diferenças entre os tecidos bem como entre essas espécies, expandindo ainda mais o repertório biológico desse receptor.

FIGURA 3 – ESQUEMA DO RECEPTOR RAGE E SUAS VARIANTES



Algumas formas variantes da proteína RAGE. DN-RAGE (dominante negativo – RAGE) fica presa à membrana mas não possui a cauda citosólica, portanto é não transdutora de sinal. sRAGE é a forma solúvel.

FONTE: Schmidt et al, 2001.

O RAGE é expresso em vários tipos celulares como, por exemplo, endotélio vascular, músculo liso, monócitos, macrófagos, células do epitélio glomerular e células neuronais; mas em baixos níveis em homeostase. Em situações de aumento da atividade celular ou estresse como no desenvolvimento do *Diabetes mellitus*, inflamação e doença de Alzheimer, a expressão do RAGE é aumentada nas células afetadas (SCHMIDT *et al.*, 1999; NISHIKAWA *et al.*, 2000; SCHMIDT e STERN, 2000; HUDSON *et al.*, 2002, ROY *et al.*, 2006). Recentemente estudos mostraram que RAGE tem função central da regulação de tumores, mas ainda não identificaram as regiões responsáveis pelo aumento da expressão da proteína RAGE associados ao câncer (ARRIERO *et al.*, 2006).

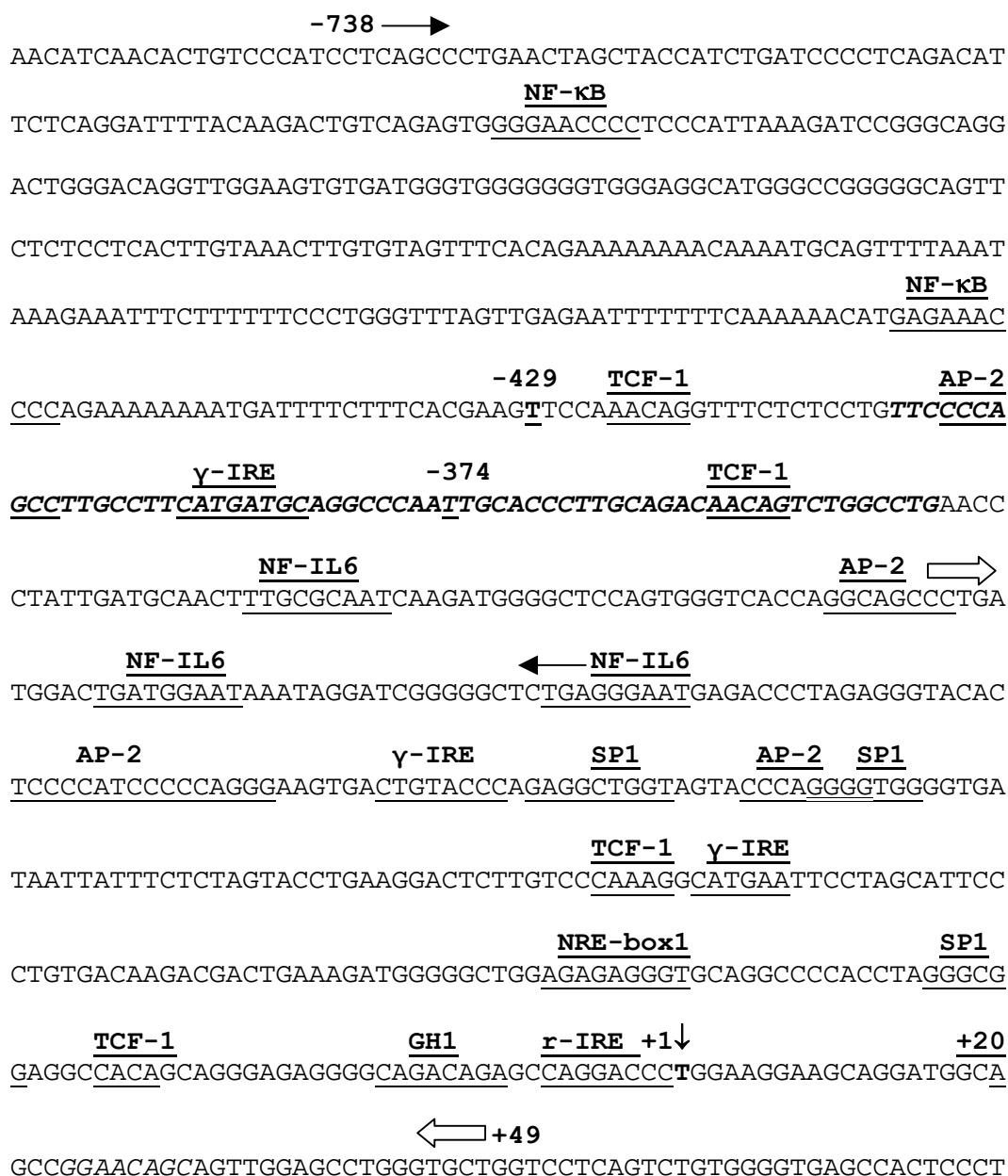
Estudos têm identificado vários outros ligantes de RAGE incluindo o peptídeo β -amilóide, uma proteína envolvida com doença de Alzheimer; S100/calgranulinas, uma família de polipeptídeos que atua como citocinas na resposta pró-inflamatória, entre outros (HUDSON *et al.*, 2002; STERN *et al.*, 2002). Além disso, o RAGE pode atuar como receptor de moléculas de adesão celular possibilitando o recrutamento de leucócitos para as regiões onde é expresso (SCHMIDT e STERN, 2000).

1.3.1 O gene RAGE

O gene RAGE está localizado no cromossomo 6p21.3, próximo a genes do complexo maior de histocompatibilidade classe II e classe III, que contém inúmeras sobreposições e genes em duplicata envolvidos principalmente na resposta inflamatória e imune (HUDSON *et al.*, 2001b). No total, possui 11 exons e 10 íntrons, e codifica para uma proteína de 404 aminoácidos (SUGAYA *et al.*, 1994, GenBank Number D28769). Até o momento, cerca de 50 polimorfismos já foram identificados nas seqüências de DNA de exons, íntrons e regiões 5'- e 3'-UTR do gene RAGE (Tabela 1).

Na região 5'UTR de RAGE foram identificados alguns sítios regulatórios. A região -751 a -629 é necessária para regulação positiva pelo Fator Nuclear- κ B em resposta a AGE e TNF- α (fator α de necrose tumoral); e a região -239 a -89 é regulada positivamente por E2 (17 β - estradiol) através do complexo nuclear Sp-1 (TANAKA *et al.*, 2000), além de outros sítios identificados por análise computacional mostrados na Figura 4 (LI e SCHMIDT, 1997). Uma vez que estes são sítios regulatórios, polimorfismos nestas regiões podem interferir na expressão do RAGE. A figura 5 mostra os polimorfismos mais freqüentes descritos para o gene RAGE e sua localização (KANKOVÁ *et al.*, 2005).

FIGURA 4 – SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE



Seqüência de nucleotídeos do exon 1 e região 5'UTR do gene RAGE, retirada do GenBank Number D28769 (SUGAYA *et al.*, 1994) que foi analisada neste projeto. Sublinhados encontram-se alguns possíveis sítos regulatórios. As setas horizontais indicam o início dos pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse trabalho, as largas o par -285/+49 e as finas o par -738/-246. Também estão em destaque os principais SNPs encontrados nessa região e a del 63pb está em negrito itálico. O nucleotídeo +1 foi considerado como descrito por Hudson *et al.*, 2001 e está indicado pela seta vertical.

FONTE: adaptado de LI e SCHMIDT, 1997.

TABELA 01 – FREQUÊNCIA DOS PRINCIPAIS POLIMORFISMOS DO GENE RAGE

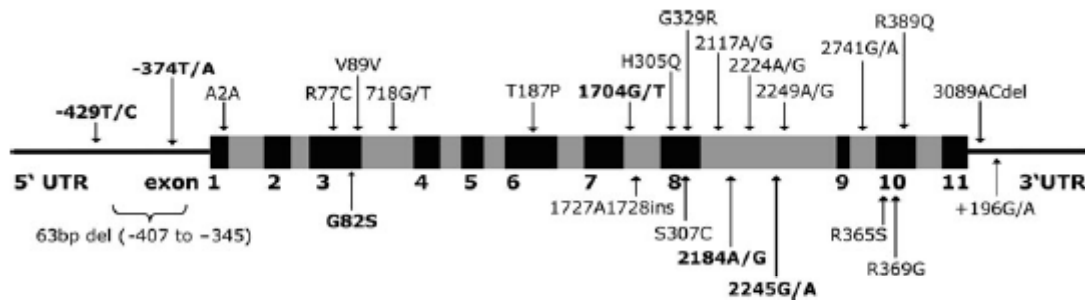
Polimorfismo	Região	Frequência do alelo menor
-1420 (GTT)n	5' UTR	ND
-1393G>T	5' UTR	ND
-1390G>T	5' UTR	ND
-1202G>A	5' UTR	NA
Deleção-407 a -345 (63del)	5' UTR	Del <1%
-429T>C	5' UTR	C= 7%
-374T>A	5' UTR	A=19%
Ala2Ala (GCA/GCT) +20A>T	Exon 1	T=14%
67C>G	Íntron 1	G=17%
Lys37Ser	Exon 2	Ser < 1%
Arg77Cys	Exon 3	Cys < 1%
Gly82Ser	Exon 3	Ser = 5%
Val89Val (GTG/GTC)	Exon 3	C=5%
Gly90Gly (GCT/GCA)	Exon 3	A=5%
718 G>C	Íntron 3	T=8%
Thr187Pro	Exon 6	Pro < 1%
1704G>T	Íntron 7	T=5%
A Ins 1727	Íntron 7	ND
His305Gln	Exon 8	Gln < 1%
Ser307Cys	Exon 8	Cys = 1%
Gly329Arg	Exon 8	Arg < 1%
2117A>G	Íntron 8	ND
2184A>G	Íntron 8	G=16%
2224A>G	Íntron 8	ND
2245G>A	Íntron 8	A=8%
2249A>G	Íntron 8	ND
2741G>A	Íntron 9	ND
Leu363Leu (CTG/TTG)	Exon 10	T=1%
Arg389Gln	Exon 10	Gln < 1%
CA Del 3089	3' UTR	CA Del < 1%

ND = não determinada

UTR: região não traduzida

FONTE: Adaptado de Hudson *et al*, 2002.

FIGURA 5 – POLIMORFISMOS MAIS FREQUENTES DO GENE RAGE



Principais polimorfismos do gene RAGE. Os mais frequentes estão representados em negrito. FONTE: KANKOVÁ *et al.*, 2005.

Hudson *et al.* (1998) descreveram nove sítios polimórficos utilizando a técnica de SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), sendo sete localizados em exons e dois em íntrons. Apenas quatro dos polimorfismos observados levaram a alterações não-sinônimas: Gly82Ser (exon 3), Thr187Pro (exon 6), Gly329Arg (exon 8) e Arg389Gln (exon 10). Destas apenas a substituição glicina por serina no códon 82 (G82S) resulta em alteração de aminoácido funcional. A substituição da glicina na posição 82 pela serina provoca um aumento de afinidade de RAGE por AGEs.

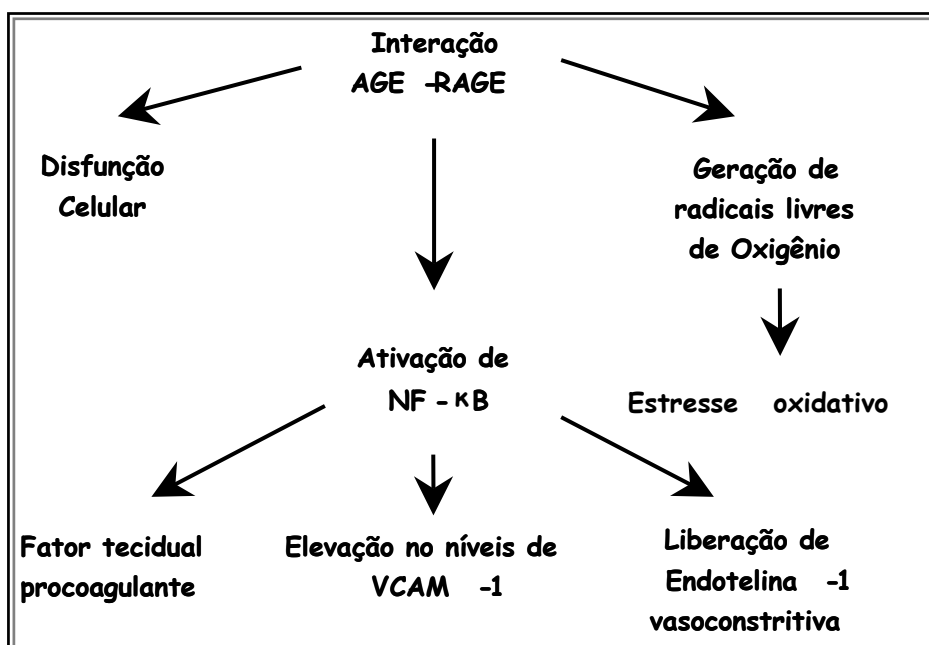
Juntamente com o polimorfismo G82S, a região promotora do gene RAGE vem sendo associada a patologias. Hudson *et al.* (2001a) descreveram oito novos sítios polimórficos nesta região. Entre estes o polimorfismo -429T>C é particularmente interessante uma vez que a frequência do alelo C está aumentada no grupo de diabéticos tipo 2 com retinopatia quando comparada com a de controles normais.

O genótipo AA do polimorfismo -374T>A do RAGE está associado com um controle metabólico inadequado em pacientes diabéticos do tipo 1 com doença cardiovascular e excreção urinária aumentada de albumina, sugerindo uma interação gene-ambiente no desenvolvimento da nefropatia diabética e complicações cardiovasculares (PETTERSON-FERNHOLDM *et al.*, 2003). Achados semelhantes foram descritos por Santos *et al.* (2005) que mostraram que o alelo -374A está associado à redução do risco de isquemia em Afro-Brasileiros com diabetes tipo 2. Falcone *et al.* (2004 e 2005a) também apontaram que o alelo -374 A em homozigose está associado com menor risco para a doença arterial coronariana e com a severidade da doença coronariana.

1.4 Interação RAGE-AGE

A ligação AGE-RAGE em certos tipos celulares leva ao estresse oxidativo e ao aumento da concentração do fator de transcrição nuclear NF- κ B (LI e SCHMIDT, 1997). Este fator de transcrição modula a expressão de moléculas de adesão celular vascular e outros genes relacionados à resposta pró-inflamatória, ao estado de pró-coagulação e à vasoconstrição, conseqüentemente serão aumentados os níveis de VCAM-1 (molécula de adesão celular), endotelina-1 (responsável pela vasoconstrição), fator tecidual e trombosmodulina (relacionados ao estado de pró-coagulação), IL-1 α , IL-6 e TNF α (citocinas da resposta pró-inflamatória) (SCHMIDT e STERN, 2000; SINGH *et al.*, 2001; HUDSON *et al.*, 2002; BASTA *et al.*, 2004; LAPOLLA *et al.*, 2005). A Figura 6 mostra a representação esquemática dos efeitos da interação RAGE – AGE.

FIGURA 6 – PRINCIPAIS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO AGE-RAGE



FONTE: Adaptado de Lapolla *et al.*, 2005.

1.5 Associação de AGEs, RAGE e *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante do defeito na secreção da insulina, na sua ação ou ambos. A hiperglicemia crônica do paciente com diabetes esta associada com danos, disfunções e insuficiência de vários órgãos que ocorrem em longo prazo (American Diabetes Association, 2008). Concomitante as alterações do metabolismo glicêmico, o paciente com *Diabetes mellitus*, apresenta uma patologia de característica incurável e crônica, com manifestações de complicações vasculares, renais, cardíacas, neurológicas, oftalmológicas e infecciosas. As complicações cardiovasculares são a principal causa de morte em pacientes com diabetes tipo 2, atingindo cerca de 75%, sendo 50% relacionados à doença arterial coronária (DAC) e 15% ao acidente vascular cerebral (OLIVEIRA *et al.*, 2000). A maioria dos pacientes com *Diabetes mellitus* pode ser classificada como tipo 1 (deficiência absoluta de insulina) ou tipo 2 (resistência à insulina) e respondem por cerca de 10% e 90%, respectivamente, do total de indivíduos diabéticos, sendo as demais subclasses como a diabetes gestacional e outros tipos específicos, menos freqüentes (BURTIS e ASHWOOD, 2006).

O estado de hiperglicemia tem sido considerado como um importante fator no aumento dos danos relacionados com o estado diabético (PEPPA *et al.*, 2003; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2000). Três mecanismos têm sido propostos para explicar como o estado de hiperglicemia crônico causa essas complicações micro e macrovasculares: ativação da proteína quinase C (PKC); aumento da via aldose redutase; e formação dos produtos finais de glicação avançada – AGEs (SINGH *et al.*, 2001). Portanto, no paciente com diabetes, a maior disponibilidade de glucose circulante e por tempo prolongado justifica a possibilidade da concentração dos AGEs ser maior em relação aos não-diabéticos (PEPPA *et al.*, 2003).

O acúmulo dos AGEs pode ocasionar danos vasculares importantes que afetam a remodelagem dos tecidos e ativam a proliferação de músculo liso alterando a permeabilidade vascular. Os danos também podem incluir alterações nos fatores de coagulação. Os AGEs podem contribuir na retinopatia do diabético onde seus efeitos podem resultar em derrame vascular (GRAU *et al.*, 2001). Alguns estudos ainda indicam que os AGEs podem ter um papel importante no desenvolvimento de

doença coronariana, esta que é a principal causa de morte prematura em pacientes diabéticos (WAUTIER *et al.*, 2001; BASTA *et al.*, 2004).

Em pacientes diabéticos foi observado a superexpressão do gene RAGE numa variedade de lesões vasculares (GRAU *et al.*, 2001; PEPPA *et al.*, 2003; BASTA *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2006). Isso sugere que as complicações observadas no estado de diabetes podem ser agravadas com a ligação AGE-RAGE (HUDSON *et al.*, 2002).

Até o momento, a única forma conhecida de reduzir a função 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 (WAUTIER, *et al.*, 1996; SOULIS *et al.*, 1997; WOLFFENBUTTEL *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar variações genéticas da região promotora do gene RAGE.

2.2 Objetivos Específicos

- Amplificar fragmentos de DNA da região promotora do gene RAGE (-738 a +49) de 97 indivíduos classificados em três grupos: CTRL (controle, ausência de diabetes e DAC), DM2+DAC+ (presença de diabetes tipo 2 associada à doença arterial coronariana) e DAC+ (presença da doença arterial coronariana sem diabetes);
- Sequenciar os produtos de amplificação obtidos;
- Analisar as seqüências obtidas através de programas de bioinformática;
- Identificar variações genéticas;
- Comparar a distribuição e as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos encontrados entre os grupos em estudo (controle, DM2+DAC+ e DAC+ não diabéticos);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (Registro CEP- Nº 480.017.08.03; CAAE: 0011.0.091.000-08).

3.1 Amostra

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Professor Geraldo Picheth e oriundas do seu projeto de doutorado junto ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (PICHETH, tese de doutorado 2007). Estas amostras já estavam caracterizadas e o DNA genômico extraído e armazenado.

Do grupo total de 320 pacientes, noventa e sete amostras (30,3%) foram selecionadas. Todos os pacientes em estudo foram submetidos à cineangiocoronariografia e/ou cateterismo nos serviços de hemodinâmica do Hospital Cardiológico Costantini. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes de iniciar o procedimento de cineangiocoronariografia pelo médico que conduziu o procedimento. Os pacientes encontravam-se com jejum de 8 a 12 horas. Dados clínicos e antropométricos foram obtidos dos laudos dos procedimentos e pela coleta de informações do prontuário.

As amostras em estudo foram subdivididas em três grupos designados como: grupo controle (CTRL; n=29) caracterizado pela ausência de diabetes e doença cardiovascular, grupo diabéticos tipo 2 associado com doença arterial coronariana (DM2+DAC+; n=33) e grupo com doença arterial coronariana sem a presença associada de diabetes tipo 2 (DAC+; n=35). A seleção não foi aleatória, sendo selecionado para o estudo amostras com alterações expressivas nos marcadores para controle da glicemia ou na severidade da doença arterial coronária, bem como perfis eletroforéticos anômalos na PCR-SSCP ou análise de heteroduplex, obtidos de estudos prévios.

A presença de doença arterial coronariana foi definida angiograficamente pela presença de estenose maior ou igual a 50% em qualquer das artérias coronárias, como preconizado por RINGQVIST *et al.* 1987.

O *Diabetes mellitus* foi caracterizado utilizando os critérios da Associação Americana de Diabetes (critérios 2006). Foram excluídos na seleção dos pacientes, aqueles que apresentavam doença hepática severa, insuficiência ou doença pulmonar, acidente vascular cerebral ou insuficiência renal severa. A Tabela 2 sumariza os critérios para a classificação da amostra.

TABELA 2 – CRITÉRIOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Grupos	angiografia	status glicêmico
Controle (CTRL)	Estenose < 50% em todas as artérias coronárias	<ul style="list-style-type: none"> • Glicemia de jejum < 99 mg/dL • HbA_{1C} < 6,5% • Histórico clínico para diabetes negativo • Sem uso de hipoglicemiantes
Diabéticos tipo 2 com DAC (DM2+DAC+)	Estenose ≥ 50% em qualquer coronária	<ul style="list-style-type: none"> • Glicemia de jejum > 126 mg/dL • TOTG (75 g) 2 h > 200 mg/dL • História clínica de diabetes positiva • HbA_{1C} > 7,0% • Uso de hipoglicemiantes
Presença de doença arterial coronariana sem diabetes (DAC+)	Estenose ≥ 50% em qualquer coronária	<ul style="list-style-type: none"> • Glicemia de jejum < 99 mg/dL • HbA_{1C} < 6,5% • Histórico clínico para diabetes negativo • Sem uso de hipoglicemiantes

TOTG: teste oral de tolerância à glicose
HbA_{1C}: hemoglobina glicada A_{1C}

3.2 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído de sangue total, coletado na presença de EDTA tripotássico (Vacutainer, BD), utilizando o procedimento descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). Para uso, as concentrações das amostras foram normalizadas para 100 ng/μL, estando armazenadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular a -20° C. O DNA de algumas amostras sofreram nova extração com o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art 28-9042-65);

3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a identificação de variações genéticas na região promotora do gene RAGE, duas regiões foram inicialmente selecionadas. Oligonucleotídeos iniciadores foram planejados para amplificar as regiões -795 a -246 e -285 a +49 gerando produtos de PCR com 550 bp e 334 bp, respectivamente. Porém não foi possível obter o produto de 550 bp isoladamente, mas sim este associado a outros produtos inespecíficos, apesar de várias tentativas de ampliar a especificidade da reação de PCR. A opção foi amplificar a região promotora a montante do gene, utilizando oligonucleotídeos iniciadores descritos por Hudson *et al.* (2001a), que abrangem a região promotora do gene RAGE de -738 até +49, gerando um amplicon de 787pb. Somente um produto de amplificação desta região foi obtido e com bom rendimento.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram analisados *in silico* por programas gratuitos e disponíveis no sítio <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. Esta análise mostrou que grampos e anelamento entre os dois oligonucleotídeos (F e R) é de baixa energia, portanto não afetando o anelamento destes iniciadores ao DNA molde. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela fabricante Bioneer, com as seqüências mostradas a seguir.

PROM -738/+49-F-5'-CAG CCC TGA ACT AGC TAC CAT-3'

PROM -738/+49-R-5'- AGCACCCAGGCTCCAAC-3'

PROM -285/+49-F-5'-CCT GAT GGA CTG ATG GAA T-3'

PROM -285/+49-R-5'-AGCACCCAGGCTCCAAC-3'

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL e as condições otimizadas estão descritas na Tabela 3.

TABELA 3 – CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DE PARTE DA REGIÃO DO PROMOTOR DO GENE RAGE

Reagentes	Região Promotora			
	-738/+49		-285/+49	
	Concentração final (volumes para reação de 25µL)			
Oligonucleotídeos iniciadores (10 pmol/µL cada)	5,0 pmol, cada	(0,5 µL de cada)	10,0 pmol, cada	(1,0 µL de cada)
DNA molde (100 ng/µL)	100ng	(1,0 µL)	100ng	(1,0 µL)
Tampão Taq 10X	1 X	(2,5 µL)	1 X	(2,5 µL)
dNTP 5 mM	0,2 mM	(1 µL)	0,2 mM	(1 µL)
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM	(0,75 µL)	1,5 mM	(0,75 µL)
Água reagente estéril	qsp 25 µL	(18,55 µL)	qsp 25 µL	(16,95 µL)
Taq DNA polimerase (5U/µL)	1U	(0,2 µL)	4 U	(0,8 µL)
	Taq DNA polimerase Platinum (1U)			
Ciclo térmico	1 ciclo: 94°C → 2 min 30 ciclos: 94°C → 1 min 58°C → 1 min 72°C → 1 min 30 seg 1 ciclo: 72°C → 10 min		1 ciclo: 94°C → 1 min 34 ciclos: 94°C → 30 seg 48°C → 30 seg 72°C → 50 seg 1 ciclo: 72°C → 5 min	

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

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em agarose 1,0% em tampão TBE 1X, sendo aplicados 2 µL do produto de PCR + 3 µL tampão de aplicação (glicerol 30% v/v acrescido de 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol). Para a visualização do produto de PCR, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizado sob luz ultra-violeta (302 nm) e registrado utilizando câmara CCD (Biochemi, UVP LTDA).

3.4 Seqüenciamento dos produtos de PCR

3.4.1 Preparo do DNA amplificado para seqüenciamento

A cerca de 20 μL do produto de PCR (20 a 50 ng) foram adicionados 0,26 μL (5,2U) de Exonuclease I (GE Healthcare, 20 U/ μL) e 0,77 μL (1,54U) de fosfatase alcalina de camarão (GE Healthcare, 2 U/ μL) O sistema de reação foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 minutos, seguidos de 30 minutos a 80°C para inativação das enzimas (SAMBROOK et al 1989).

3.4.2 Reação de Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento de DNA foi realizada utilizando o sistema contendo didesoxirribonucleotídeos acoplados a cromóforos fluorescentes utilizando o Kit ET *terminator* (GE Healthcare) em seqüenciadores automáticos modelos 377 (Applied Biosystems) e MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

A aproximadamente 15 ng do produto de PCR livre de iniciadores (3 μL para o amplicon de 334pb e 4 μL para o de 787pb), foram adicionados 1 μL do oligonucleotídeo iniciador F ou R (10 pmol/ μL), 4 μL do reagente ET e o volume foi completado para 10 μL com água ultra-pura. O sistema de reação foi levado ao termociclador programado para 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos na temperatura de anelamento (58°C para a região -738/-246 e 48°C para a região -285/+49) e 60 segundos a temperatura de extensão (60° C para a região -285/+49 e 65° C para a região -738/ -246).

Para seqüenciar os produtos de PCR de 787pb, o oligonucleotídeo iniciador reverso utilizado foi o seguinte: -246 R-5'-TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT-3' (HUDSON *et al.*, 2001a). Assim pôde-se obter uma seqüência menor, mas com melhor qualidade.

3.4.3 Purificação da reação de sequenciamento

Ao volume total da reação de sequenciamento (10 μ L) foram adicionados 30 μ L de água reagente estéril e 60 μ L de isopropanol. A reação foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugada a 11,3 g por 25 minutos. O precipitado da reação foi lavado com 250 μ L de etanol 70%, seguido de centrifugação a 11,3 g por 10 minutos. Após aspirar e descartar o sobrenadante o sedimento foi seco em estufa 37°C (~ 40 minutos) ou a vácuo (~ 30 minutos). As amostras foram solubilizadas em formamida para aplicação (1 ou 2 μ L) no gel de sequenciamento.

3.5 Análise de bioinformática

3.5.1 Montagem das seqüências contíguas

A montagem das seqüências contíguas a partir das seqüências direta (F) e reversa (R) foram realizadas utilizando os programas Phred/Phrap (EWING *et al*, 1998; <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e CONSED (GORDON *et al*, 1998) em ambiente Linux, com os seguintes passos:

- (1º) Criação dos diretórios: a partir de um diretório base, um diretório para cada amostra (nomeada com o número correspondente da amostra) foi criado e, dentro destes diretórios, mais três sub-diretórios (“chromat_dir”, “edit_dir” e “phd_dir”), necessários aos programas, foram adicionados. O diretório “chromat_dir” recebeu os arquivos de eletroforetogramas diretamente do seqüenciador automático. O apêndice 1 exemplifica a hierarquia dos diretórios.
- (2º) Execução do “PhredPhrap”: para a montagem das seqüências é necessário entrar no diretório edit_dir de cada amostra para executar o programa “PhredPhrap”, e depois visualizar as montagens com o programa CONSED.

- (3º) Chamada de bases e atribuição de qualidades: a primeira etapa da montagem é realizada pelo programa Phred, que aceita arquivos de eletroforetograma (.abi e .esd, dos seqüenciados ABI377 e MegaBace1000, respectivamente) como entrada e executa a “chamada de bases” ou *basecalling*, atribuindo valores de qualidade para cada uma das bases. O programa Phred gera como saída arquivos texto (contendo a chamada de bases e suas qualidades) com extensão “.phd” (Apêndice) que são armazenados no diretório “phd_dir”.
- (4º) Montagem das seqüências contíguas: a montagem das seqüências contíguas é feita pelo programa Phrap. Ele gera as seqüências contíguas a partir de regiões de sobreposição entre as seqüências individuais, levando em consideração suas atribuições de qualidade. O programa Phrap gera arquivos de saída contendo as seqüências e as qualidades das seqüências contíguas geradas (arquivos .fasta.screen.contigs e .fasta.screen.contigs.qual, respectivamente) um arquivo com a análise da montagem (.phrap.out) e um arquivo que pode ser usado como entrada para o programa CONSED (.fasta.screen.ace.1). Todos os arquivos gerados pelo Phrap estão no diretório “edit_dir”.
- (5º) Edição das montagens: as montagens obtidas com o programa Phrap foram visualmente analisadas com o programa CONSED (apêndice 2), em ambiente LINUX, e editadas para identificação e retirada das regiões correspondentes aos oligonucleotídeos iniciadores ou de regiões de baixa qualidade.
- (6º) Alinhamento dos contigs: após a edição das seqüências, o contig de cada amostra foi salvo, e foram alinhados através do programa ClustalW (THOMPSON *et al*, 1994) no Bioedit, em ambiente windows.
- (7º) Análise dos polimorfismos: as bases divergentes no alinhamento foram anotadas e os eletroforetogramas das amostras contendo divergência foram analisados para aceitação ou não do polimorfismo. Quando confirmado o polimorfismo todas as seqüências foram genotipadas através de seus respectivos eletroforetogramas.

Para cada amostra foram realizadas um mínimo de três reações de sequenciamento. Com os dados compilados com o programa PhredPhrap, foram feitas triagens das seqüências *contig* de cada amostra para verificar sua qualidade e a necessidade de repetição do sequenciamento. As seqüências de qualidade foram analisadas individualmente na busca de novos polimorfismos. Os polimorfismos em heterozigose não são mostrados em destaque neste programa quando comparados a uma seqüência consenso, devido ao sistema atribuir obrigatoriamente uma das bases por critérios de qualidade. Os polimorfismos em homozigose podem ser observados no alinhamento pela diferença do nucleotídeo com o consenso e são mostradas em destaque pelo programa.

Algumas amostras, apesar de terem sido submetidas a várias reações de sequenciamento, a seqüência obtida foi de baixa qualidade e não foi possível realizar a genotipagem. Estas amostras, portanto, foram excluídas de algumas análises, sendo apresentadas como “nd” (não determinado) na tabela de freqüências genotípicas.

Para o polimorfismo -374 T>A, não foram analisadas as amostras que apresentaram a 63 Del, pela sobreposição destes polimorfismos.

3.6 Análises estatísticas

As comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras não-pareadas ou pela análise de variância (ANOVA). Para as variáveis descontínuas foram utilizados os testes de Chi-quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fischer bidirecional.

As freqüências genotípicas foram obtidas por contagem dos genótipos e os cálculos de freqüências alélicas foram realizadas com o programa ARLEQUIM versão 2.0. Os pacotes estatísticos Statistica para Windows versão 5.5 (StatSoft, Tulsa, CA), RxC (Miller 1999) foram utilizados nas análises. Uma probabilidade (P) inferior a 0,05 foi considerada significativa em todas as análises.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

O receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) reconhece múltiplos ligantes (STERN *et al.*, 2002). A ativação de RAGE promove uma sinalização intracelular com resultantes não completamente conhecidos. Está estabelecido que o gene RAGE ativa o fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), responsável por aumentar a expressão de várias proteínas associadas ao processo aterogênico e inflamatório (LI *et al.*, 1997; SCHMIDT e STERN, 2000; SINGH *et al.*, 2001; HUDSON *et al.*, 2002; BASTA *et al.*, 2004; LAPOLLA *et al.*, 2005). Os ligantes mais estudados de RAGE, os produtos de glicação avançada (AGEs), mostram exuberante elevação na concentração sérica no indivíduo com *Diabetes mellitus* e em processos associados ao estresse oxidativo, como o inflamatório e notadamente a insuficiência renal (BROWNLEE *et al.*, 1995; NISHIKAWA, *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2001; LAPOLLA *et al.*, 2005).

As características dos ligantes de RAGE, como as beta-fibrilas presentes na doença de Alzheimer, S100/calgranulinas envolvidas no processo inflamatório e os AGEs, sugerem que este receptor celular tem uma função biológica relevante e pode ser um elemento importante para o estudo e compreensão de vários processos patológicos (STERN *et al.*, 2002).

A relevância de RAGE é ressaltada por estudos que mostraram o efeito do RAGE solúvel (sRAGE), uma isoforma C-truncada de RAGE que perdeu o sítio de ancoragem na membrana celular e circula no plasma, reduz o processo inflamatório e as complicações associadas ao diabetes em roedores (WAUTIER *et al.*, 1996).

Os estudos de variações genéticas do gene RAGE buscando associação com processos patológicos tem mostrado resultados conflitantes. Enquanto alguns estudos não evidenciaram associações (GLOBOCNICK *et al.*, 2003; JIXIONG *et al.*, 2003; KANKOVÁ *et al.*, 2005), outros têm relacionado polimorfismos de RAGE principalmente com complicações do *Diabetes mellitus*, processos inflamatórios e aterosclerose (HOFMANN *et al.*, 2003; PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003; FALCONE *et al.*, 2005a).

Os sítios polimórficos mais estudados de RAGE concentram-se no exon 3 e na região promotora do gene (HUDSON *et al.*, 1998; HUDSON *et al.*, 2001a). No exon 3, o polimorfismo que promove a substituição de uma glicina por serina no codon 82 (G82S), produz uma proteína com mais afinidade pelos ligantes (AGEs). O alelo 82S tem elevada prevalência em orientais (cerca de 20%), sendo menos freqüente (< 10%) em populações ocidentais (LIU *et al.*, 1999; HUDSON *et al.*, 1998). Na população brasileira, a freqüência alelo 82S é de cerca de 3% (TORRES monografia 2006) e não está associado ao diabetes e a doença arterial coronariana (PICHETH tese de doutorado 2007).

As variações genéticas da região promotora de RAGE têm revelado associação dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e a deleção de 63pb (-407 a -345) com complicações do diabetes tipos 1 e 2, bem como com a severidade da doença cardiovascular (PETTERSON FERNHOLD *et al.*, 2003; FALCONE *et al.*, 2004; FALCONE *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005). Estes sítios polimórficos ganharam especial atenção com a descoberta de que são funcionais, com os alelos raros -429C, -374A e 63del, condicionando aumento na expressão da proteína RAGE (HUDSON *et al.*, 2001a) Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa na Universidade Federal do Paraná, mostraram que em uma população predominantemente Euro-Brasileira o alelo -429C está associado com o diabetes tipo 1 (PICHETH *et al.*, 2007b) e o genótipo -374AA está associado a menor severidade para a doença arterial coronariana em indivíduos com diabetes tipo 2 (PICHETH *et al.*, 2007a).

Os resultados observados pelo nosso grupo de pesquisa na UFPR apontam, com amplo suporte da literatura, que a região promotora de RAGE é uma região importante para estudos de associação deste gene com processos patológicos (LI e DICKSON, 1997; LI e SCHMIDT, 1997; LI *et al.*, 1998; YONEKURA *et al.* 2005; PULLERITS *et al.* 2005). Notadamente, não foram evidenciados na literatura estudos que buscassem a detecção de novas variações genéticas na região promotora de RAGE. A maioria dos trabalhos de determinação de freqüência alélica utilizam a metodologia de PCR-RFLP, que caracteriza apenas um sítio polimórfico específico e conhecido. Ensaio preliminares de triagem na busca de variações genéticas no promotor de RAGE utilizando análise de heterodúplex e PCR-SSCP identificaram amostras com padrão eletroforético diferente do usual, sugerindo novas mutações a

serem caracterizadas nesta região (PICHETH tese doutorado 2007). Assim, neste trabalho se buscou identificar novas variações genéticas na região promotora do gene RAGE utilizando a técnica de seqüenciamento de DNA por ser mais informativa e conclusiva que as demais metodologias.

4.1 Amostra

As características demográficas da amostra encontram-se na Tabela 4.

TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA

Características	Amostra total (n=97)	Crítérios
Sexo M/F (%)	57/40 (58,8/41,2)	
Etnia	95% Euro-Brasileiros 5% Afro-Brasileiros	
Idade (anos)	61,5±10 (média ±DP) Mediana: 62,5 AV: 37 - 83	
IMC (kg/m ²)	26,5±4,6 Mediana: 25,8 AV: 17,9 – 45,7	Normal: 18,5 – 24,9
Hipertensão	53 (54,6%)	>140/90 mmHg
Dislipidemia	46 (47,4%)	Colesterol > 240 mg/dL
História familiar positiva para DAC	37 (38,1%)	Evento coronariano no pai antes de 55 anos ou na mãe antes dos 65 anos
<i>Diabetes mellitus</i> (tipo 2)	33 (35%)	Glicemia ≥ 126 mg/dL
Tabagismo	45 (46,4%)	Uso regular de qualquer número de cigarros

AV: amplitude de variação

Na amostra predomina o sexo masculino (58,8%) e a etnia Euro-Brasileira (95%) em decorrência das características dos pacientes que procuraram o Hospital Costantini, uma instituição privada, local de obtenção da amostra. Como todos os indivíduos presentes na amostra foram submetidos ao procedimento angiográfico, cujo objetivo foi revelar o grau de estenose das coronárias, as características descritas na Tabela 4 são compatíveis com o

esperado para este grupo de pacientes. Os fatores de risco para doença arterial coronariana compreendem a hipertensão, uso de tabaco, história familiar, presença de diabetes, obesidade (elevação no IMC - índice de massa corporal) e dislipidemia, elementos presentes em expressiva porcentagem na amostra em estudo (TAN *et al.*, 2001; PIEGAS *et al.*, 2003; AUER *et al.*, 2005; YOLOGLU *et al.*, 2005).

4.2 Análises dos seqüenciamentos de DNA

Foram seqüenciadas noventa e sete amostras nas duas orientações, em múltiplos ensaios, para cada região do promotor do gene RAGE. Os dados brutos dos seqüenciadores automáticos de DNA Megabace1000 e ABI 377 foram processados pelos programas PhredPhrap que são executados automaticamente, sem a interferência do usuário. O programa CONSED consiste numa interface gráfica, onde é possível conferir visualmente a qualidade das seqüências e editá-las, tendo sido usado para avaliar e editar as seqüências obtidas. Como nem todos os polimorfismos em heterozigose aparecem no consenso como ambigüidades (base "N" ou não identificada), todos os eletroforetogramas foram visualmente analisados com o programa CONSED, para identificação de possíveis heterozigotos. Após a edição das seqüências, o consenso foi exportado no formato FASTA e posteriormente usado no alinhamento com as demais seqüências consenso das outras amostras. O alinhamento foi feito com o programa BIOEDIT.

O procedimento de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para o fragmento da região promotora do gene RAGE de -285 a +49 foi eficiente, produzindo amplicons com boa concentração e sem bandas inespecíficas. Entretanto, a amplificação da região de -795 a -246 não foi bem sucedida. Entre os possíveis fatores responsáveis pelo insucesso apontamos a seqüência do oligonucleotídeo iniciador *forward* ou problemas associados à síntese deste iniciador, uma vez que sua utilização produz bandas inespecíficas, nas várias condições de PCR testadas.

Para resolver este problema utilizamos os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Hudson *et al* (2001a), que permitem amplificar toda a região em estudo, assim obtivemos um amplicon de 787pb isoladamente em concentrações satisfatórias, e a partir deste amplicon é que foi possível seqüenciar a região -738 a -246. O procedimento para PCR foi adaptado para o uso da Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), uma polimerase de desempenho superior (*hot start*) que permite eliminar bandas inespecíficas.

O seqüenciamento de DNA é o método mais utilizado para identificação de novas mutações e polimorfismos, embora seja uma técnica relativamente laboriosa (KWOK, 2003). A abordagem mais utilizada é o seqüenciamento direto dos produtos de PCR com terminadores fluorescentes em seqüenciadores de DNA automáticos (FRANÇA *et al.*, 2002; KWOK, 2003). Embora as metodologias de seqüenciamento de DNA tenham evoluído significativamente ao longo dos últimos anos, o padrão eletroforético nem sempre é homogêneo ao longo da seqüência e também é variável entre as amostras, além disso, vários artefatos podem ocorrer.

Como o DNA humano é diplóide, nas posições polimórficas de indivíduos heterozigotos aparecem duas bases diferentes e sobrepostas no mesmo sítio. Este é um dos elementos que dificulta a interpretação do seqüenciamento, necessitando com muita freqüência uma análise individual, base a base, de cada amostra em estudo. Programas computacionais que realizam estas análises de modo automático não têm uma alta eficiência e pequenas alterações na qualidade da seqüência podem levar a resultados falsos positivos (KWOK, 2003).

O aparecimento de um padrão desigual nos picos do eletroforetograma, que caracterizam as bases no seqüenciamento, torna difícil o discernimento entre os picos duplos porque uma das duas bases para um mesmo sítio polimórfico pode ser desproporcionalmente menor do que a outra. Neste caso o algoritmo que identifica a base na reação automática de seqüenciamento pode falhar na determinação correta da base (KWOK, 2003). Como mencionado, a intensidade dos picos no eletroforetograma de uma posição em heterozigose não é necessariamente a mesma (ou seja, metade da intensidade da mesma base no homozigoto). Estas distorções e variações são principalmente decorrentes da técnica (tipo de terminador utilizado), da

qualidade da amostra, do sistema de seqüenciamento e do programa computacional utilizado (KRONICK, 1997).

A presença de artefatos na reação de seqüenciamento do DNA é freqüente, resultando na necessidade de seqüenciar nas duas orientações. A utilização de mais de uma técnica com princípios diferentes pode eliminar ou pelo menos mudar a natureza de artefatos que dificultam a identificação de variações genéticas em heterozigose (KRONICK, 1997).

Neste estudo foi empregado o método enzimático com o sistema ET *terminator* (mistura de reagentes para seqüenciamento contendo DNA polimerase e terminadores marcados com fluoróforos – GE Healthcare), que apresenta como vantagem a utilização de cromóforos fluorescentes (fluoróforos) que podem ser excitados quase que uniformemente em um mesmo comprimento de onda (488 nm) e que afetam minimamente a mobilidade eletroforética (FRANÇA *et al*, 2002). Isto assegura uniformidade nos resultados.

No entanto, a metodologia com o sistema ET não é isenta de interferências, podendo ocorrer uma incorporação diferencial dos didesoxirribonucleotídeos, e falhas na incorporação. Outro elemento que pode afetar a reação de seqüenciamento é a parada prematura da seqüência pela presença de estruturas secundárias no DNA molde e anomalias na mobilidade eletroforética também devido à formação destas estruturas secundárias, levando a um deslocamento do pico no eletroforetograma, às vezes podendo confundir um heterozigoto com uma inserção (KRONICK, 1997).

Várias metodologias para a preparação dos produtos de PCR para a reação de seqüenciamento têm sido descritas; entre as quais, a técnica que utiliza exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão (SAP) para degradar os oligonucleotídeos iniciadores e nucleotídeos não incorporados, um dos principais fatores que interferem nas reações de seqüenciamento (FRANÇA *et al*, 2002). Esta etapa é essencial, pois entre os principais interferentes da reação de seqüenciamento estão os oligonucleotídeos iniciadores e dideoxinucleotídeos não incorporados (KRONICK, 1997).

Neste trabalho, aproximadamente 95% das reações de seqüenciamento processadas foram satisfatórias, porém a qualidade das bases foi variável, possivelmente pelos fatores citados anteriormente. Por causa disto,

os amplicons foram seqüenciados em ambas as orientações e sempre que possível em mais de uma reação.

As seqüências obtidas para os amplicons -285/+49 foram em geral de melhor qualidade do que as seqüências obtidas para a região -738/-246. É possível que além dos fatores já descritos que afetam o seqüenciamento, a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores possa também afetar a qualidade das seqüências obtidas. O planejamento *in silico* de novos oligonucleotídeos iniciadores, com auxílio de programas mais complexos, poderia resultar em iniciadores mais específicos para esta região, talvez evitando os problemas observados. Também a aquisição de oligonucleotídeos iniciadores com maior grau de pureza seria uma opção válida na tentativa de solucionar os problemas descritos. Entre as ações empregadas para melhorar a qualidade das seqüências, o aumento da temperatura de extensão na reação de seqüenciamento foi o fator que mais contribuiu para melhorar os resultados.

4.2.1 Seqüenciamento da região de -285 a +49

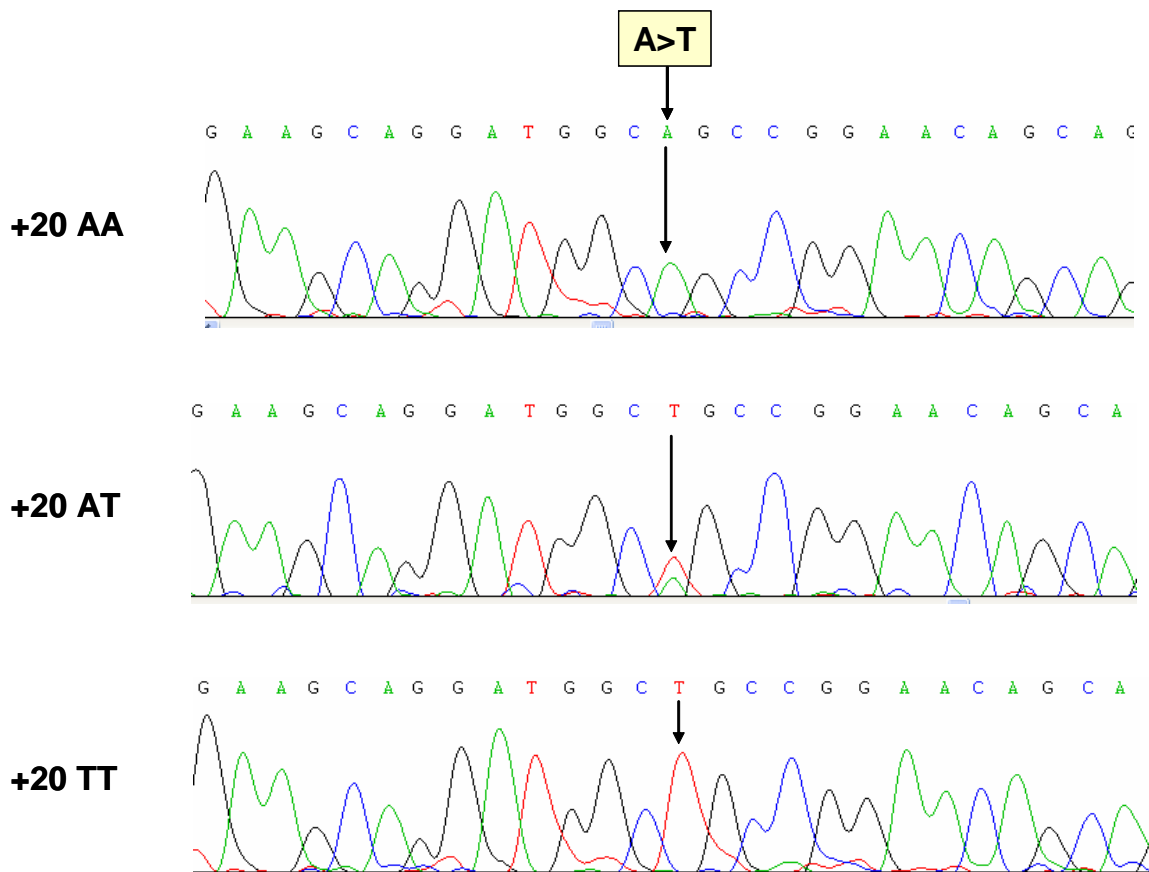
Analisando as seqüências da região promotora do gene RAGE de -285 a +49 foram encontrados duas variações genéticas, ambos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs), o +20A>T e o -242A>T. O primeiro já descrito por Hudson *et al* (2001a), consiste na substituição sinônima do códon do segundo aminoácido da proteína RAGE (exon 1: GCA → GCT) que codifica para alanina (Ala2Ala). Duas das amostras (uma do grupo CTRL e uma do grupo DM2+DAC+) em estudo não foram genotipadas nesta região por apresentar repetidamente baixa qualidade na reação de seqüenciamento.

A nova variação genética encontrada, o SNP -242A>T, está localizado na região do possível sítio de regulação por NF-IL6 (fator de transcrição nuclear IL-6), este um importante ativador transcricional de genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias. É relevante ressaltar a proximidade desta variação com os já conhecidos sítios polimórficos funcionais (-429, -374 e 63Del) da região promotora de RAGE. Estudos para avaliar a funcionalidade deste polimorfismo são pertinentes e sugeridos. Não foi possível obter a

seqüência desta região em uma das amostras do grupo CTRL. Não foi observado o genótipo homozigoto raro (-242TT) em nenhuma das amostras estudadas.

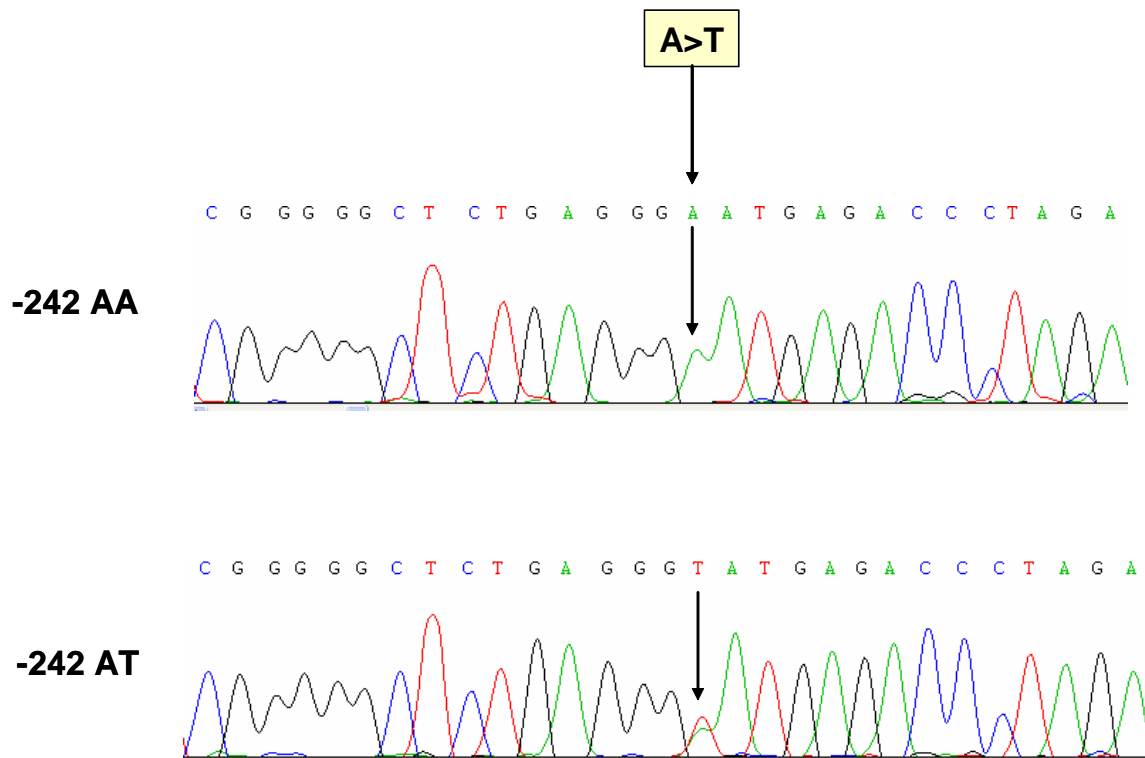
As Figuras 7 e 8, respectivamente, mostram a caracterização destes polimorfismos através da reação de seqüenciamento.

FIGURA 7 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -285 A +49 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA +20A>T



Eletroforetograma da reação de seqüenciamento da região -285 a +49 do gene RAGE de três amostras, evidenciando a variação genética +20A>T. O eletroforetograma superior mostra o polimorfismo +20A>T em homozigose (+20AA), no centro o genótipo heterozigoto +20AT e na parte inferior o genótipo homozigoto recessivo +20TT. O SNP +20 A>T está localizado no exon 1 de RAGE, no 2º códon (alanina). A substituição +20A>T uma mutação sinônima.

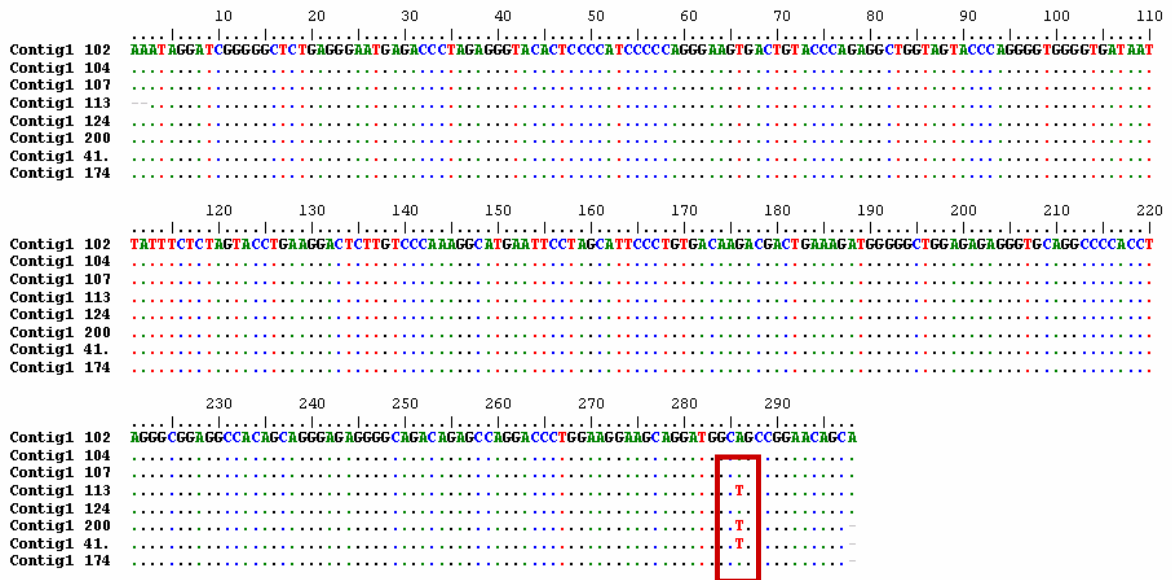
FIGURA 8 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -285 A +49 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -242A>T



Eletroforetograma da reação de seqüenciamento da região promotora do gene RAGE na região -285 a +49, evidenciando o sítio de substituição -242 A>T. O eletroforetograma superior mostra o perfil para o genótipo -242 AA (homozigose). Na parte inferior o genótipo heterozigoto -242 TA. O genótipo homozigoto recessivo -242 TT não foi encontrado nas amostras estudadas.

Após a análise de todos os eletroforetogramas, as seqüências consenso obtidas dos programas PhredPhrap e CONSED, foram alinhadas em busca de novos polimorfismos. A figura 9 mostra o alinhamento das seqüências consenso de algumas amostras da região -285 a +49 evidenciando o SNP +20 A>T. Não foram encontrados outros polimorfismos além dos já citados. Para todos os sítios que apresentaram divergências da seqüência consenso no alinhamento, foram analisados os respectivos eletroforetogramas, sendo descartados como polimorfismos os resultados que não apresentavam consistência para a mesma amostra nos dois sentidos do seqüenciamento.

FIGURA 9 – ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -285 A +49 DE ALGUMAS AMOSTRAS EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA +20A>T



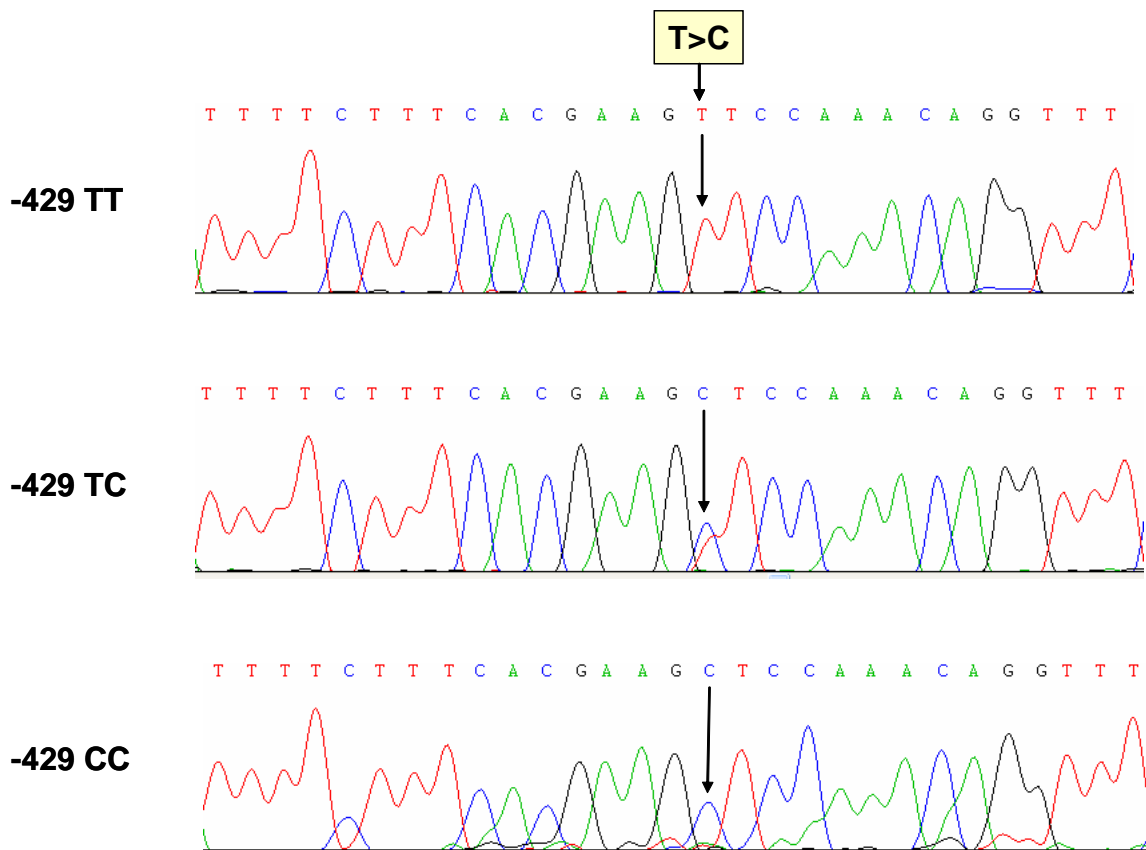
Alinhamento realizado com o programa BioEdit de algumas das amostras seqüenciadas na região -285 a +49 da região promotora do gene RAGE. Em evidência o polimorfismo +20A>T. Todas as amostras com T (timina), em destaque, apresentam o polimorfismo em heterozigose.

4.2.2 Seqüenciamento da região de -738 a -246

O seqüenciamento da região promotora do gene RAGE com oligonucleotídeos iniciadores que amplificam a região -738 a -246 permitiu a detecção dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e a 63Del, todos já caracterizados na literatura (HUDSON *et al* 2001) e estudados pelo nosso grupo de pesquisa da UFPR com a metodologia de PCR-RFLP (HEIDEMANN 2005; TORRES 2006; PICHETH *et al* 2007). O polimorfismo -374 T>A se sobrepõe à região da deleção de 63 pb. No grupo 2 (DM2+DAC+) não foi possível confirmar o genótipo de uma das amostras para o polimorfismo -429T>C devido à baixa qualidade da seqüência.

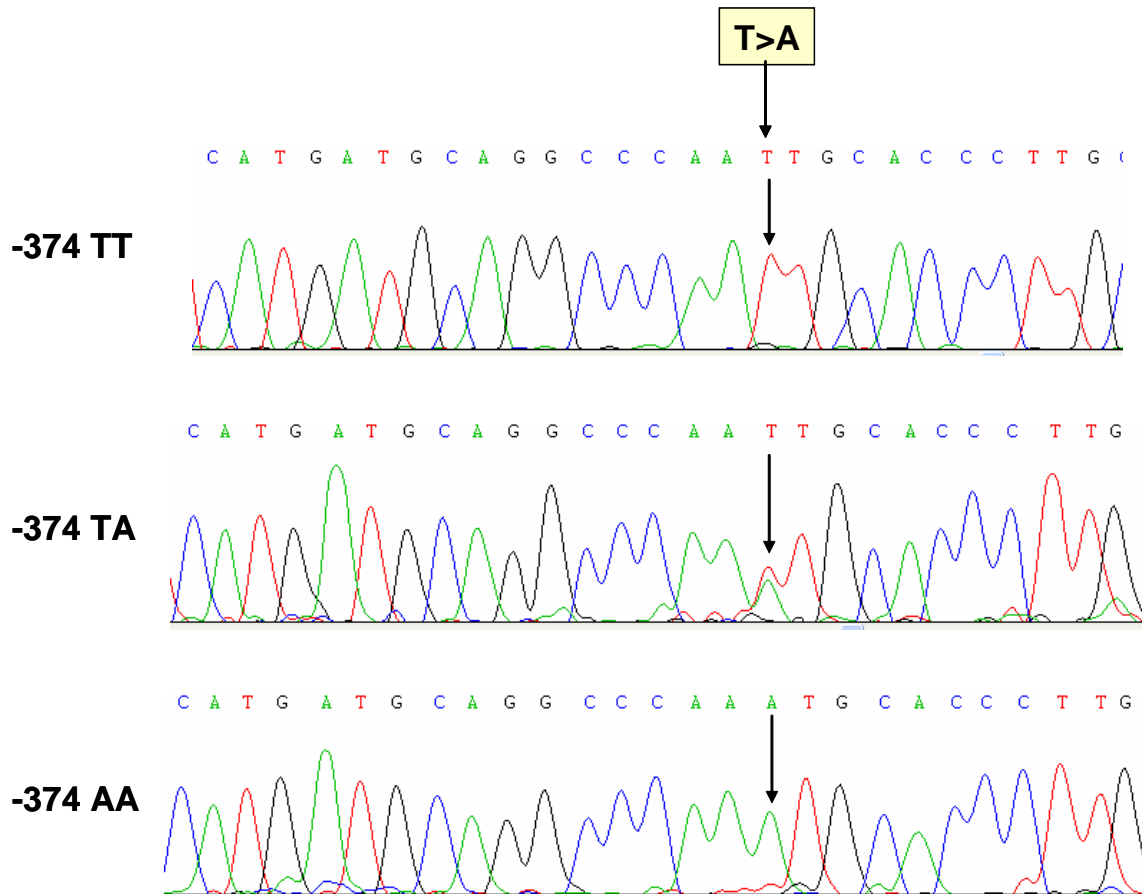
As figuras 10, 11 e 12 mostram, respectivamente, exemplos das reações de seqüenciamento para os polimorfismos -429T>C, -374T>A e a deleção de 63pb (-407_-345del).

FIGURA 10 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -429 T>C



Eletroforetograma da reação de seqüenciamento da região promotora do gene RAGE de -738 a -246 de três amostras, evidenciando o sítio de substituição -429T>C. O eletroforetograma superior mostra o polimorfismo -429 T>C em homocigoto dominante (-429 TT), no centro o genótipo heterocigoto -429 TC e na parte inferior o genótipo homocigoto recessivo -429 CC.

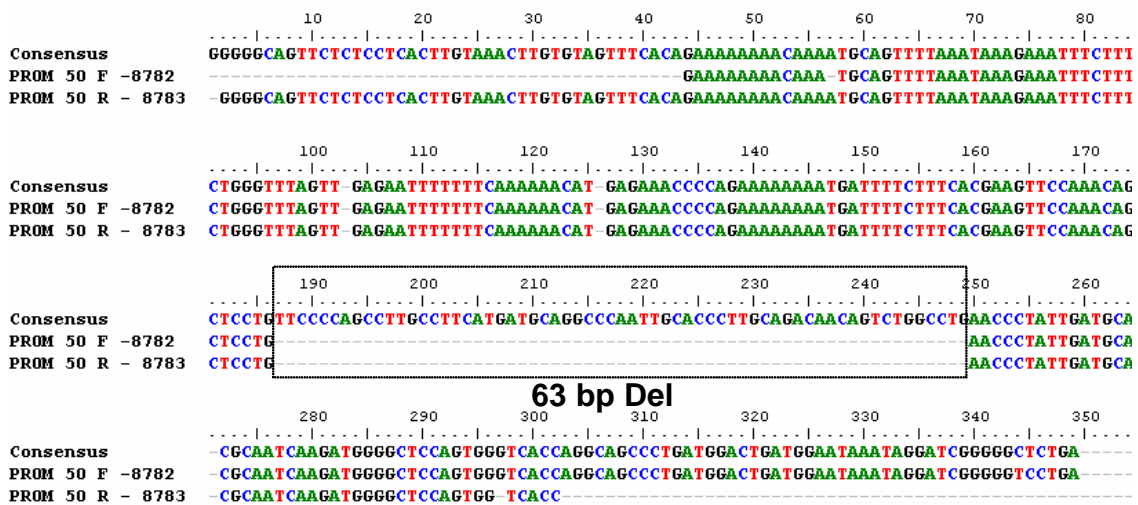
FIGURA 11 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -374 T>A



Eletroforetograma da reação de seqüenciamento da região promotora do gene RAGE de -738 a -246 de três amostras, evidenciando o sítio de substituição -374 T>A. O eletroforetograma superior mostra o polimorfismo -374 T>A em homocigose dominante (-374 TT), no centro o genótipo heterocigoto -374 TA e na parte inferior o genótipo homocigoto recessivo -374 AA.

Através da eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1% foram identificadas três amostras com a deleção de 63 pb (-407_-345del), mas somente a amostra que apresentava a deleção em homozigose foi seqüenciada. A presença da deleção de 63pb em heterozigose torna impossível o seqüenciamento direto da região. Assim, será necessário clonar os produtos de PCR e seqüenciar os clones para confirmar estas variantes. A Figura 12 mostra o alinhamento das bases para a amostra com deleção de 63 pb em homozigose.

FIGURA 12 – ALINHAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -738 A -246 EVIDENCIANDO A DELEÇÃO DE 63PB EM HOMOZIGOSE

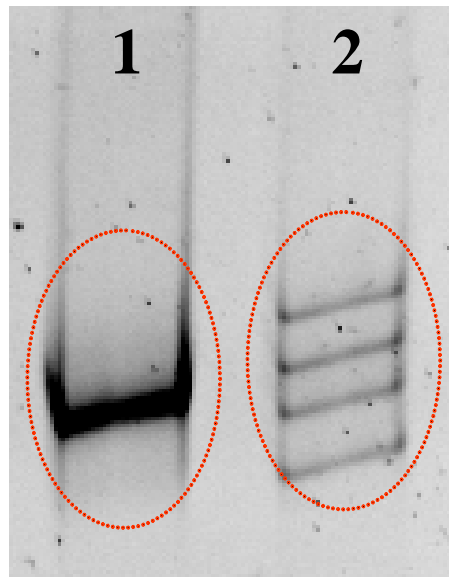


Alinhamento com o programa BioEdit. Foi utilizada como comparativo (*consensus*) a seqüência depositada no GenBank (D28769). Em destaque a região com a deleção de 63pb, em amostra em homozigose para esta variação.

Neste trabalho foi identificada na região -738 a -246 uma nova variação genética, a deleção de duas timinas nas posições -505_-504 (-505_-504deITT) em uma única amostra. Esta variação ainda não está descrita na literatura.

Quando da identificação desta nova variante (-505_-504deITT) revimos em um estudo anterior e observamos que esta mesma amostra apresentava um padrão diferente na análise de SSCP – Heteroduplex (PICHETH tese de doutorado 2007). As condições de análises para identificação de polimorfismos conformacionais de fita Simples (SSCP) permitem analisar polimorfismos associados a diferentes conformações da fita de DNA e formação de heteroduplex (alteração de conformação de fita dupla). Primeiramente ocorre a desnaturação do DNA e imediatamente o resfriamento em gelo, em seguida a corrida eletroforética em baixa temperatura. O perfil eletroforético da análise de heteroduplex para a mesma amostra obtida por Picheth (tese de doutorado 2007) está mostrado na Figura 13.

FIGURA 13 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA ANÁLISE DE HETRODUPLEX DE PARTE DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE



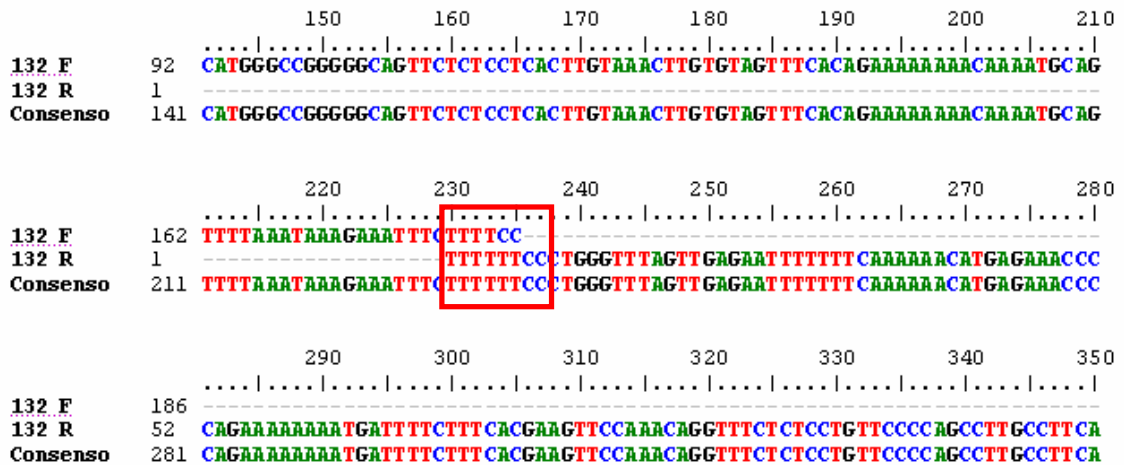
Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% corado com brometo de etídeo evidenciando análise de heteroduplex do fragmento -590 /-246 da região promotora do gene RAGE. Na linha 1 padrão de migração de amostra de individuo homozigoto com seqüência selvagem e na linha 2 padrão de migração anômalo, que sugere variabilidade genética.

FONTE: PICHETH tese de doutorado 2007.

Esta nova variação está muito próxima (menos de 100 pares de base) do polimorfismo funcional -429T>C sugerindo que pode também afetar a transcrição de gene. Estudos para verificar a funcionalidade desta variação devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

As figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, o alinhamento e o eletroforetograma da amostra com deleção TT na posição -505_-504.

FIGURA 14 – ALINHAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE DE -738 A -246 DA AMOSTRA EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -505_-504deITT



Alinhamento com o programa BioEdit evidenciando (em destaque) a variação genética -505_-504deITT. Foi utilizada como comparativo (consenso) a seqüência depositada no GenBank (D28769).

FIGURA 15 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EVIDENCIANDO A VARIAÇÃO GENÉTICA -505_-504deITT



Electroforetograma da reação de seqüenciamento da região promotora do gene RAGE de -738 a -246 de uma mesma amostra, evidenciando o sítio -505_-504deITT. O electroforetograma superior mostra a seqüência no sentido F e na parte inferior no sentido R.

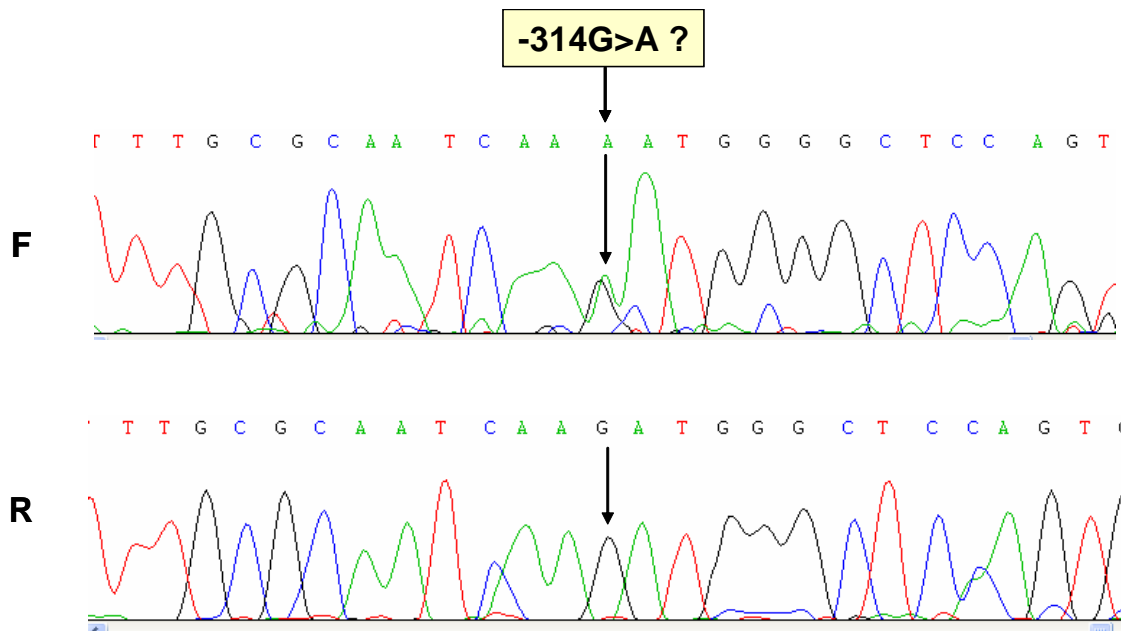
Com a utilização do programa PhredPhrap não foi possível obter uma seqüência consenso utilizando as seqüências completas nos dois sentidos (F e R), pois a presença de deleção em heterozigose causa a sobreposição de duas seqüências defasadas em 2 nucleotídeos a partir do sítio da deleção (-504). A análise em separado dos alinhamentos das seqüências com oligonucleotídeos iniciadores *forward* (F) e reverso (R), permitiu inferir a alteração de bases na amostra como mostrado na Figura 15.

A região -738 a -246 apresentou a maior freqüência de amostras com seqüências de baixa qualidade. Em algumas amostras foram observadas extensas regiões com bases de baixa qualidade, que podem ter sido causadas por estruturas secundárias nos oligonucleotídeos iniciadores ou no DNA molde. O aumento na temperatura de extensão na reação de seqüenciamento permitiu uma melhor qualidade nas seqüências, reforçando a hipótese do efeito de estruturas secundárias.

4.2.3 Resultados inconclusivos

Os resultados obtidos para algumas amostras (~7%) não permitiram definir conclusivamente a seqüência da região estudada, não sendo, portanto, descartada a possibilidade de serem novas variantes. Uma vez que foram feitas diversas tentativas para se determinar a seqüência destas amostras, é possível que a falta de sucesso se deva a baixa qualidade do DNA molde, contaminação da amostra com outro DNA ou mesmo presença de algum inibidor da reação de seqüenciamento/PCR. A figura 16 exemplifica uma reação de seqüenciamento de uma destas amostras.

FIGURA 16 – ELETROFORETOGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO -738 A -246 DO GENE RAGE EXEMPLIFICANDO UM RESULTADO INCONCLUSIVO



Electroforetograma da reação do seqüenciamento da região -738 a -246 do gene RAGE de uma mesma amostra, evidenciando a possível variação genética -314 A>G. O electroforetograma superior (seqüência no sentido F) mostra o possível variação em heterozigose, porém no electroforetograma inferior (seqüência com orientação oposta – sentido R) aparece uma base única. Por não apresentar a variação nas duas orientações e por ser uma região com elevado *background* não é possível caracterizar uma variação genética.

4.3 Comparações entre as freqüências genótípicas e alélicas para a região promotora do gene RAGE em estudo

Os polimorfismos encontrados na região promotora de RAGE +20A>T, -374T>A, -429T>C e a deleção de 63 pb, já estavam descritos na literatura (HUDSON *et al.*, 2001a) e suas freqüências foram estabelecidas para várias populações, inclusive a população brasileira. Torres (monografia 2006) estudando estes polimorfismos por PCR-RFLP em Euro e Afro-Brasileiros demonstrou que as freqüências genótípicas e alélicas são semelhantes entre estes grupos, exceto para o polimorfismo -374T>A que ocorre em uma freqüência significativamente menor (23,1% versus 34,7%) nos Afro-Brasileiros.

As novas variações genéticas da região promotora de RAGE, -242A>T e a 505_-504delTT, foram encontrados pela primeira vez neste estudo, que analisou uma população predominantemente de Euro-Brasileiros. O polimorfismo +20A>T já foi descrito (HUDSON *et al.*, 2001a), mas sua freqüência não foi analisada na população brasileira.

Nas Tabelas 5 e 6 estão descritas as freqüências genótípicas e alélicas para as variações genéticas encontradas neste estudo e sua análise estatística.

TABELA 5 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS PARA VARIAÇÕES NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO

Grupos Genótipos	CTRL n=29	DM2+DAC+ n=33	DAC+ n=35	P*	Amostra total (n=97)
+20A>T				0,781	
A/A	23 (82,1%)	25 (78,1%)	26 (74,3%)		74 (77,9%)
A/T	5 (19,9%)	6 (18,8%)	9 (25,7%)		20 (21,0%)
T/T	0 (0%)	1 (3,1%)	0 (0%)		1 (1,1%)
ND	1	1	0		2
-242A>T				0,197	
A/A	28 (100,0%)	30 (90,9%)	34 (97,1%)		92 (95,8%)
A/T	0 (0,0%)	3 (9,1%)	1 (2,9%)		4 (4,2%)
T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)
ND	1	0	0		1
-374T>A				0,062	
T/T	14 (50,0%)	15 (48,4%)	10 (29,4%)		39 (41,9%)
T/A	14 (50,0%)	13 (41,9%)	17 (50,0%)		44 (47,3%)
A/A	0 (0,0%)	3 (9,7%)	7 (20,6%)		10 (10,8%)
ND	1 ^a	2	1 ^a		4
63del				0,746	
I/I	28 (96,6%)	32 (97,0%)	34 (97,1%)		94 (96,9%)
I/D	1 (3,4%)	0 (3,0%)	1 (2,9%)		2 (2,1%)
D/D	0 (0,0%)	1 (0,0%)	0 (0,0%)		1 (1,0%)
-429T>C				0,040	
T/T	18 (62,1%)	27 (79,4%)	30 (85,7%)		75 (78,1%)
T/C	11 (37,9%)	4 (12,5%)	5 (14,3%)		20 (20,8%)
C/C	0 (0,0%)	1 (3,1%)	0 (0,0%)		1 (1,1%)
ND	0	1	0		1
-505_-504delTT				0,628	
TT/TT	28 (100,0%)	32 (97,0%)	34 (100,0%)		94 (98,9%)
TT/--	0 (0,0%)	1 (3,0%)	0 (0,0%)		1 (1,1%)
-/-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)
ND	1	0	1		2

*P: comparação entre os três grupos pelo teste exato de Fisher bidirecional (RxC)

ND: genótipo não determinado

^a: presença da Deleção de 63pb (-407_-345del)

I: Inserção; D: Deleção

A comparação das frequências alélicas entre os grupos em estudo também foi realizada. Na Tabela 6 a distribuição alélica e o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A Tabela 7 mostra a comparação para as variações genéticas encontradas.

TABELA 6 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG PARA VARIAÇÕES GENÉTICAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO

Grupos Alelos	CTRL (%)	DM2+DAC+ (%)	DAC+ (%)	Amostra Total (%)
+20A>T				
Alelo raro T	8,9	12,5	12,9	11,6
95% IC	[1 – 16]	[7 – 21]	[5 – 21]	[7 – 16]
H-W*	0,603	0,410	0,383	0,784
-242A>T				
Alelo raro T	0,0	4,7	1,4	3,1
95% IC	[0 – 0]	[0 – 10]	[0 – 4]	[0 – 6]
H-W*	sr	0,781	0,931	0,834
-374T>A				
Alelo raro A	25,0	32,8	45,6	35,1
95% IC	[14 – 36]	[21 – 49]	[34 – 57]	[28 – 42]
H-W*	0,08	0,656	0,963	0,791
63del				
alelo raro Del	1,7	3,0	1,4	2,10
95% IC	[0-5]	[0 – 7]	[0 - 4]	[0 – 4]
H-W*	0,933	≤ 0,001	0,931	≤ 0,001
-429T>C				
Alelo raro C	19,0	9,4	7,1	19,8
95% IC	[9 0 29]	[0 – 4]	[1 – 13]	[14 – 25]
H-W*	0,207	0,134	0,649	0,793
-505_-504delTT				
Alelo raro delTT	0,0	1,5	0,0	0,5
95% IC	[0]	[0 – 4]	[0]	[0 – 2]
H-W*	sr	0,929	sr	0,959

*H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (P, teste do chi-quadrado);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

sr: sem resultado

TABELA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA VARIAÇÕES GENÉTICAS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NOS GRUPOS EM ESTUDO

Polimorfismos grupos	+20A>T	-242A>T	-374T>A	63Del	-429T>C	-505_-504delTT
CTRL vs DM2+ DAC+	$\chi^2=0,394$ P=0,530	$\chi^2=2,692$ P=0,100	$\chi^2=0,882$ P=0,347	$\chi^2=0,223$ P=0,636	$\chi^2=2,33$ P=0,126	$\chi^2=0,855$ P=0,355
CTRL vs DAC+	$\chi^2=0,486$ P=0,485	$\chi^2=0,806$ P=0,369	$\chi^2=5,63$ P=0,017	$\chi^2=0,018$ P=0,893	$\chi^2=4,05$ P=0,044	nc
DM2+ DAC+ vs DAC+	$\chi^2=0,003$ P=0,950	$\chi^2=1,226$ P=0,268	$\chi^2=2,25$ P=0,133	$\chi^2=0,404$ P=0,525	$\chi^2=0,221$ P=0,638	$\chi^2=1,06$ P=0,301

P: teste do chi-quadrado
nc: não pode ser calculado

As frequências genotípicas (Tabela 5) não diferiram entre os grupos estudados, exceto para o polimorfismo -429T>C onde uma frequência significativamente menor ($p=0,040$) do genótipo TC foi observada entre o grupo controle (37,9%) e os grupos DM2+DAC+ (12,5%) e DAC+ (14,3%). Também foi observada uma menor frequência do alelo -429C entre os grupos controle e o DAC+ (19,0% vs 7,1% – Tabela 7). A frequência do alelo -374A foi menor no grupo controle quando comparado ao grupo DAC+ (25% vs 45%). As diferenças observadas devem ser avaliadas com cautela, uma vez que não foram encontradas no trabalho com maior número de amostras ($n=320$), do qual foram selecionadas (PICHETH tese de doutorado 2007). O fato da seleção das amostras não ser completamente aleatória, também dificulta a interpretação destes dados, sugerindo que os valores observados podem ser produto do tamanho amostral e uma amostra não randomizada.

Todas as variações genéticas em estudo, exceto a 63Del, encontram-se no esperado equilíbrio de Hardy-Weinberg. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado para a 63Del nos grupos DM2+DAC+ e DAC+ pode ser atribuído ao tamanho amostral, insuficiente para a análise de variações genéticas com frequência da ordem de 1%.

O polimorfismo +20A>T foi o mais freqüente entre as variantes ainda não estudadas em nossa população. Hudson *et al.* (2001) descreve uma freqüência de cerca de 14% para o alelo raro neste polimorfismo, em concordância com os dados obtidos (~12%) para a população brasileira. É possível que a prevalência de Euro-Brasileiros na amostra tenha sido um fator relevante para a semelhança encontrada. Como este polimorfismo não leva a uma alteração do aminoácido (mutação sinônima), era esperado que as freqüências não estivessem relacionadas com as características dos grupos em estudo.

As novas variações genéticas identificadas neste trabalho (-242A>T e -505_-504delTT) consistem de alelos raros (-242T e a presença da Del TT na posição -504_-505) com freqüências, respectivamente de 3% e 0,5% na amostra total (Tabela 6). Considerando as análises de heteroduplex realizadas por Picheth (tese de doutorado 2007), foram encontradas quatro amostras com o mesmo perfil de heteroduplex da amostra caracterizada como -505_-504delTT neste trabalho. Se as demais amostras confirmarem esta deleção é possível inferir para a população Euro-Brasileira uma freqüência desta variação genética de cerca de 1,25% (4/320, 4 amostras em um total de 320). A proximidade com outros sítios polimórficos já caracterizados como funcionais sugere que a presença desta variação também afete o nível de transcrição de RAGE. Em apoio a esta sugestão, análises *in silico* revelam que esta região pode estar envolvida na ligação de fatores associados à regulação da transcrição do gene RAGE. É relevante ressaltar que a baixa freqüência destas variantes genéticas na população estudada, mesmo que venham a ser caracterizadas como funcionais, sugerem que seu efeito esperado em processos patológicos seja muito pequeno.

Em síntese, neste trabalho, procuramos novas variações genéticas na região promotora do gene RAGE, utilizando a técnica de seqüenciamento de DNA. Duas novas variações genéticas foram encontradas. Novos estudos para caracterizar a funcionalidade destas variações genéticas devem ser realizados.

5. CONCLUSÕES

- Foram identificadas duas novas variações genéticas na região promotora do gene RAGE, -242A>T e a deleção de duas timinas no sítio -505_-504 (-505_-504delTT).
- As frequências das novas variações genéticas para a população predominantemente Euro-Brasileira estudada foi 3,1% para o alelo -242T e 0,5% para o alelo Del TT na posição -505_504.
- A frequência do polimorfismo +20A>T na amostra estudada (cerca de 12%) não difere daquela descrita para europeus.
- Não há evidências conclusivas que as de variações genéticas identificadas na região do promotor de RAGE estejam associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 2 ou a doença cardiovascular.

REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v. 31; supl. I: S55, 2008.
- ANÁLISE DE OLIGONICLEOTÍDEOS INCIADORES:
<<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>>
acesso em 31 de outubro de 2006.
- ARRIERO, M; HARJA, E; YANG, HOJIM; CRONK, K; SCHMIDT, AM; HUDSON, BI. Identification of a novel gene enhancer region upstream of the RAGE gene: implications for tumor biology. **The FASEB Journal**. v. 20, p. A228, 2006.
- AUER, J; WEBER, T; BERENT, R; LASSNIG, E; MAURER, E; LAMM, G; KVAS, E; EBER, B. Obesity, body fat and coronary atherosclerosis. **Int. J. Cardiol.** v.98, p. 227-235, 2005.
- BASTA, G; SCHMIDT, AM; CATERINA, RD. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular Research**. v. 63, p. 582-592, 2004.
- BRETT, J; SCHMIDT, AM; YAN, SD; ZOU, YS; 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.** v. 143, p. 1699-1712, 1993.
- BROWNLEE, MMD. Advanced Protein Glycosylation in Diabetes and Aging. **Annu. Rev. Med.** v. 46, p. 223-234, 1995.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **NATURE**. v. 414, p. 813-820, 2001.
- BURTIS, CA; ASHWOOD, ER ; BRUNS, DE (ED.) **Tietz textbook of clinical chemistry and Molecular Diagnostics**. 4 ed. Saunders: Philadelphia, 2006.
- DING, Q; KELLER, JN. Splice variants of the receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) in human brain. **Neuroscience Letters**. v. 373, p. 67-72, 2005.
- EWING, B; HILLIER, L; WENDL, MC; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**. v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.
- FALCONE, C; CAMPO, I; EMANUELE, E; BUZZI, MP; ZORZETTO, M; SBARSI, I; CUCCIA, M. Relationship between the -374 T/A gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. **Int. J. Mol. Med.** v. 14, p. 1061-1064, 2004.

FALCONE, C; CAMPO, I; EMANUELE, E; BUZZI, MP; 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.** v. 354, p. 111-116, 2005.

FRANÇA, LTC; CARRILHO, E; KIST, TBL. A review of DNA sequencing techniques. **Quarterly reviews or Biophysics.** v. 35, p. 169-200, 2002.

GenBank Number D28769

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=561657>

GLOBOCNIK PETROVIC, M; STEBLOVNIK, K; PETERLIN, B; PETROVIC, D. The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. **Thieme-connect.** v. 220(12), p. 873-876, 2003.

GOLDMAN, L; BENNETT, JC (ED). Cecil. Textbook of medicine. 21 ed. Saunders: Philadelphia, p. 1263 -1285, 2000.

GORDON, D; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research.** v. 8, p. 195-202. 1998.

GRAU, PW. Glicosilación em la nefropatía diabética y el envejecimiento. **Acta Med. Peruana.** XVIII: 76-82, 2001.

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

HOFMANN, MA.; DRURY, S; HUDSON, BI.; GLEASON, MR; QU, W; LU, Y; LALLA, E; MONTEIRO, J; STICKLAND, MH; BUCCIARELLI, LG.; STERN, DM; SCHIMDT, AM. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. **Genes Immunity.** v. 3, p. 123-135, 2003.

HUDSON, BI; STICKLAND, MH; GRANT, PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. Prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. **Diabetes.** v. 47, p. 1157, 1998.

HUDSON, BI; STICKLAND, MH; FUTERS, TS; GRANT, PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. **Diabetes.** v. 50, p. 1505-1511, 2001a.

HUDSON, BI; STICKLAND, MH; GRANT, PJ; FUTERS, TS. Characterization of Allelic and Nucleotide Variation Between the RAGE Gene on Chromosome 6 and a Homologous Pseudogene Sequence to Its 5' Regulatory Region on Chromosome 3. **Diabetes.** v. 50, p. 2646-2651, 2001b.

HUDSON, BI.; HOLFMAN, AM, BUCCIARELLI, L; WENDT, T; MOSER, B; LU, Y; QU, W; STERN, DM.; D`AGATTI, V; YAN, SD; YAN, SF; GRANT, PJ;

SCHMIDT, AM. Glycation and diabetes: The RAGE connection. **Curr. Sci.** v. 83, p. 1515-1520, 2002.

HUDSON, BI; ARRIERO, M; HARJA, E; MOSER, B; YANG, H; CARTER, AM; GRANT, PJ; SCHMIDT, AM. Expression of the alternatively spliced soluble RAGE variant suppresses metastatic pathways and tumor development. **The FASEB Journal.** v. 20 p. A1328-A1329, 2006a.

HUDSON, BI; ARRIERO, M; YANG, H; MOSER, B; HARJA, E; SCHMIDT, AM. Alternative splicing of the RAGE gene: analysis and characterization in humans and mice. **The FASEB Journal.** v. 20, p. A1081, 2006b.

HUDSON, BI; CARTER, AM; HARJA, E; KALEA, AS; ARRIERO, M; YANG, H; GRANT, PJ; SCHMIDT, AM. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. **The FASEB Journal.** 2007.

JIXIONG X, BILIN X, MINGGONG Y, SHUQIN L. -429 T/C and -374 T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care;** v. 26, p. 2696-1697, 2003.

KALOUSOVÁ, M; JÁCHYMOVÁ, M; MESTEK, O; HODKOVÁ, M; KAZDEROVÁ, M; TESAR, V; ZIMA, T. Receptor for advanced glycation end products – soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant.** v. 22, p. 2020-2026, 2007.

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

KRONICK, MN. Heterozygote Determination Using Automated DNA Sequencing Technology. **Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA.** Capítulo 16, p. 175-189, 1997.

KWOK, PY. Single Nucleotide Polymorphisms: methods and protocols. **Humana,** v. 212, 2003.

LAHIRI, DK; NURNBERGER, JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Reserch.** v. 19, p. 5444, 1991.

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

LI, YM; DICKSON, DW. Enhanced binding of advanced glycation endproducts (AGE) by the ApoE4 isoform links the mechanism of plaque deposition in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** v.22, p.155-8, 1997.

LI, J; SCHMIDT, AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.** v.272, p.16498-16506, 1997.

LI, J; QU, X; SCHMIDT, AM. Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphoterin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. **J. Biol. Chem.** v.273, p. 30870-30878, 1998.

LI, JH; HUANG, XR; ZHU, HJ; OLDFIELD, M; COOPER, M; TRUONG, LD; JOHNSON, RJ; LAN, HY. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF- β -dependent and -independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. **The FASEB Journal.** 2003.

LIU, Y; XIANG, K. RAGE Gly82Ser polymorphism in diabetic microangiopathy. **Diabetes Care.** v. 22, p. 616, 1999.

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

MIYAZAKI, A; NAKAYAMA, H; HORIUCHI, S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. **Trends Cardiovasc. Med.** v. 12, p. 258-262, 2002.

NAGARAJ, RH; SHIPANOVA, IN; FAUST, FM Protein cross-linking by the Maillard reaction. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 19338 – 19345, 1996.

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

OLIVEIRA, SF; GRANJA, LA; WAJCHENBERG, BL. Cardiopatia no diabético. **Rev. Bras. Cardiol.** v. 2, n. 3, p. 103 – 114, 2000.

PEPPA, M; URIBARRI, J; VALSSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin. Diabetes.** v. 21, p. 186-187, 2003.

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

PHRED, PHRAP, CONSED

< <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html> > Acesso em: 23 de abril de 2007.

PICHETH G. Associação de polimorfismos do gene do receptor de AGEs (RAGE) com fatores de risco para a doença coronariana em indivíduos com e

sem *Diabetes mellitus*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2007.

PICHETH G, COSTANTINI CO, PEDROSA FO, LEME DA ROCHA MARTINEZ T, MALTEMPI DE SOUZA E. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. **Clin Chem Lab Med.** v. 45(10), p. 1268-1272, 2007a.

PICHETH, G; HEIDEMANN, M; PEDROSA, FO; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, EA; COSTANTINI, CO; MARTINEZ, TLR; SOUZA, EM. The -429 T>C Polymorphism of the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) is Associated with Type 1 Diabetes in a Brazilian Population. **Clin Chim Acta.** v. 383, p. 163-164, 2007b.

PIEGAS, LS; AVEZUM, A; PEREIRA, JC; ROSSI NETO, JM; HOEPFNER, C; FARRAN, JA; RAMOS, RF; TIMERMAN, A; ESTEVES, JP. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **Am. Heart J.** v. 146, p. 331 – 338, 2003.

POIRIER, O; NICAUD, V; VIONNET, N. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes.** v. 50, p. 1214-1218, 2001.

PULLERITS, R; BOKAREWA, M; DAHLBERG, L; TARKOWSKI, A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. **Arthritis Res. Ther.** v. 7(4), p. 142-144, 2005.

RAMASAMY, R; VANNUCCI, SJ; YAN, SSD; HEROLD, K; YAN, SF; SCHIMIDT, AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology.** v. 15, n. 7, p. 16R-28R, 2005.

RINGQVIST, I; FISHER, LD; MOCK, M; DAVIS, KB; WEDEL, H; CHAITMAN, BR; PASSAMANI, E; RUSSELL, ROJR; ALDERMAN, EL; KOUCHOUKAS, NT; KAISER, GC; RYAN, TJ; KILLIP, T; FRAY, D. Prognostic value of angiographic indices of coronary artery disease from the coronary artery surgery study (CASS). **J Clin Invest.** v. 71, p. 1854-1866, 1983.

ROY, H; BHARDWAJ, S; BABU, M; KOKINA, I; UOTILA, S; AHTIALANSAARI, T; LAITIEN, T; HAKUMAKI, J; LAAKSO, M; HERZIG, KH; YLÄ-HERTTUALA, S. VEGF-A, VEGF-D, VEGF receptor-1, VEGF receptor-2, NF-κB, and RAGE in atherosclerotic lesions of diabetic Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **The FASEB Journal.** v. 20, p. E1550-E1559, 2006.

SAMBROOK, J; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.

SANTOS, KG; CANANI, LH; GROSS, JL; TSCHIEDEL, B; PIRES SOUTO, KL; 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**. v. 85, p. 149-156, 2005.

SCHENK, S; SCHRAML, P; BENDIK, I; LUDWIG, CU. 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.

SCHLEICHER, ED; BIERHAUS, A; HARING, HU; NAWROTH, PP; LEHMANN, R. Chemistry and pathobiology of advanced glycation end products. **Contrib. Nephrol**. v. 131, p. 1-9, 2001.

SCHMIDT, AM; YAN, SD; WAUTIER, JL; STERN, D. Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products: A Mechanism for Chronic Vascular Dysfunction in Diabetic Vasculopathy and Atherosclerosis. **Cir Res**. v. 84, p. 489-497, 1999.

SCHMIDT, AM; STERN, DM. RAGE: A new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **TEM**. v. 11, p. 368-375, 2000.

SCHMIDT, AM; YAN, SD; YAN, SF; STERN, DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 108, p. 949-955, 2001.

SHOELSON, SE; LEE, J; GOLDFINE, AB. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. v.116, p. 1793-1801, 2006.

SINGH, R; BARDEN, A; MORI, T; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**. v. 44, p. 129-146, 2001.

SOULIS, T; THALLAS, V; YOUSSEF, S; GILBERT, RE; MCWILLIAM, BG; MURRAY-MCINTOSH, RP; COOPER, ME. Advanced glycation end products and their receptors co-localize in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. **Diabetologia**. p. 619-628, 1997.

STERN, D; YAN, SD; YAN, SF.; SCHMIDT, AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 54, p. 1615 – 1625, 2002.

SUGAYA, K; FUKAGAWA, T; MATSUMOTO, KI; MITA, K, TAKAHASHI, EI; 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.

TANAKA, N; YONEKURA, H; YAMAGISHI, S; FUJIMORI, H; YAMAMOTO, Y; YAMAMOTO, H. The Receptor for Advanced Glycation End Products Is Induced by the Glycation Products Themselves and Tumor Necrosis Factor- α through Nuclear Factor- κ B, and by 17 β -Estradiol through Sp-1 in Human Vascular Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 25781-25790, 2000.

TAN, CE; CHEW, LS; CHIO, LF; TAI, ES; LIM, HS; LIM, SC; JAYAKUMAR, L; ENG, HK; PACKARD, CJ. Cardiovascular risk factors and LDL subfraction profile in type 2 diabetes mellitus subjects with good glycaemic control. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v. 51, p. 107-114, 2001.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T; KOEHLER, C; HENKEL, E; LEONHARDT, W; FUECKER, K; HANEFELD M. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA_{1c} level. **Diabetes Care**. v. 23, p. 1830-1834, 2000.

THOMPSON, JD; HIGGINS, DG; GIBSON, TJ. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TORRES, MC. Polimorfismo da região promotora e do exon 3 do gene RAGE (Receptor de Produtos de Glicação Avançada) em uma amostra da população Brasileira. Monografia de conclusão de curso em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2006.

VLASSARA, H; LI, YM; IMANI, F; WOJCIECHOWICZ, D; YANG, Z; 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.

WAUTIER, JL; WAUTIER, MP; CHAPPEY, O; ZOUKOURIAN, C; GUILLAUSSEAU, PJ; CAPRON, L. Diabetic erythrocytes bearing advanced glycation end products induce vascular dysfunctions. **Clin. Hem.** v. 16, p. 661-667, 1996.

WAUTIER, JL; GUILLAUSSEAU, PJ. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diab. Metabol.** v. 27, p. 535-542, 2001.

WANG, X; BUCALA, R; MILNE, R. Epitopes close to the apolipoprotein B low density lipoprotein receptor-binding site are modified by advanced glycation end products. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 7643-7647, 1998.

WOLFFENBUTTEL, BHR; BOULANGER, CM; CRIJINS, FRL.; HUIJBERTS, MSP; POITEVIN, P; SWENNEN, GNM.; VASAN, S; EGAN, JJ.; ULRICH, P. Breakers of advanced glycation end products restore large artery properties in experimental diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 4630 – 4634, 1998.

YOLOGLU, S; SEZGIN, AT; SEZGIN, N; OZDEMIR, R; YESILADA, E; TOPAL, E. Determination of risk factors in obese and non-obese patients with coronary artery disease. **Acta Cardiol.** v. 60, n. 6, p. 625-629, 2005.

YONEKURA, H; YAMAMOTO, Y; SAKURAI, S; PETROVA, R G; ABEDIN MD J; LI, H; YASUI, K; TAKEUCHI, M; MAKITA, Z; TAKASAWA, S; OKAMOTO, H; WATANABE, T; YAMAMOTO, H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. **Biochem J.** v. 370, p. 1097-1109, 2003.

APÊNDICES

Apêndice 1: Descrição da hierarquia dos diretórios criada para a montagem das seqüências, exemplificada pela amostra 153

Diretório base

/153

/ chromat_dir

cromatogramas.abi e .esd

/ edit_dir

arquivo .fasta.screen.ace (arquivo de montagem)

arquivo .fasta (todas as seqüências em formato FASTA)

arquivo .fasta.screen.qual (qualidade das seqüências)

arquivo .fasta.screen.contigs (contigs no formato FAST)

arquivo .fasta.screen.contigs.qual (qualidade dos contigs)

arquivo .phrap.out (informações sobre o processo de montagem)

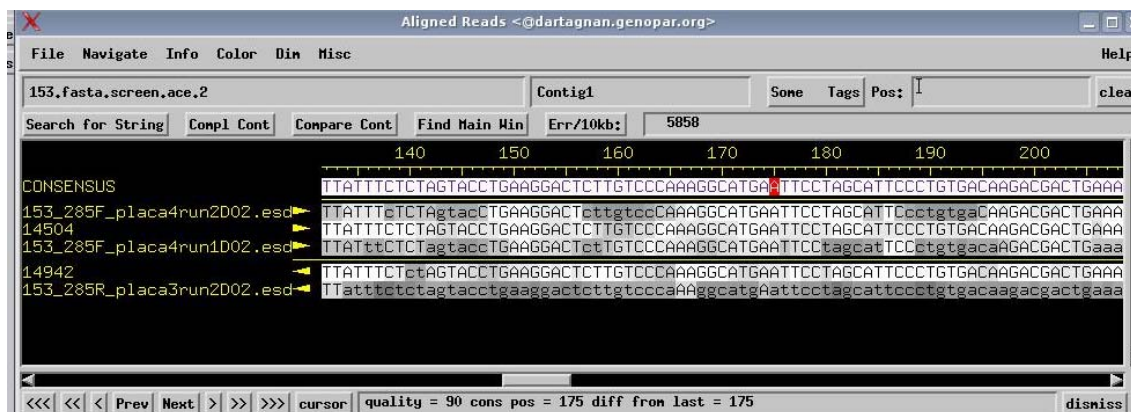
arquivo .screen.out (informações sobre vetores)

/ phd_dir

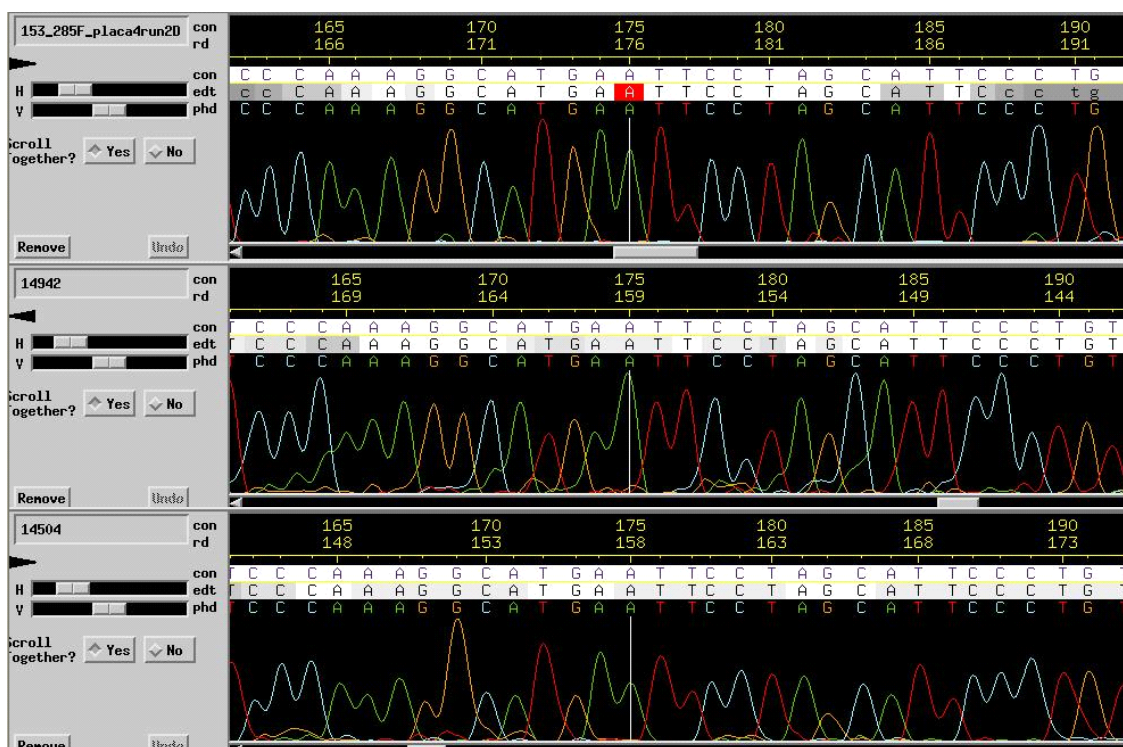
arquivos.phd (possui os valores do *basecall*)

Apêndice 2: Visualização gráfica com o programa CONSED da montagem das seqüências exemplificada pela amostra 153

A



B



Em A, a montagem da seqüência 153 a partir dos eletroforetogramas oriundos de várias reações de seqüenciamento, na primeira linha a seqüência consensus e nas linhas abaixo a seqüência de bases dos respectivos eletroforetogramas, a qualidade de cada base e as orientações do seqüenciamento também são mostradas. Em B três eletroforetogramas da mesma amostra proveniente de reações diferentes.