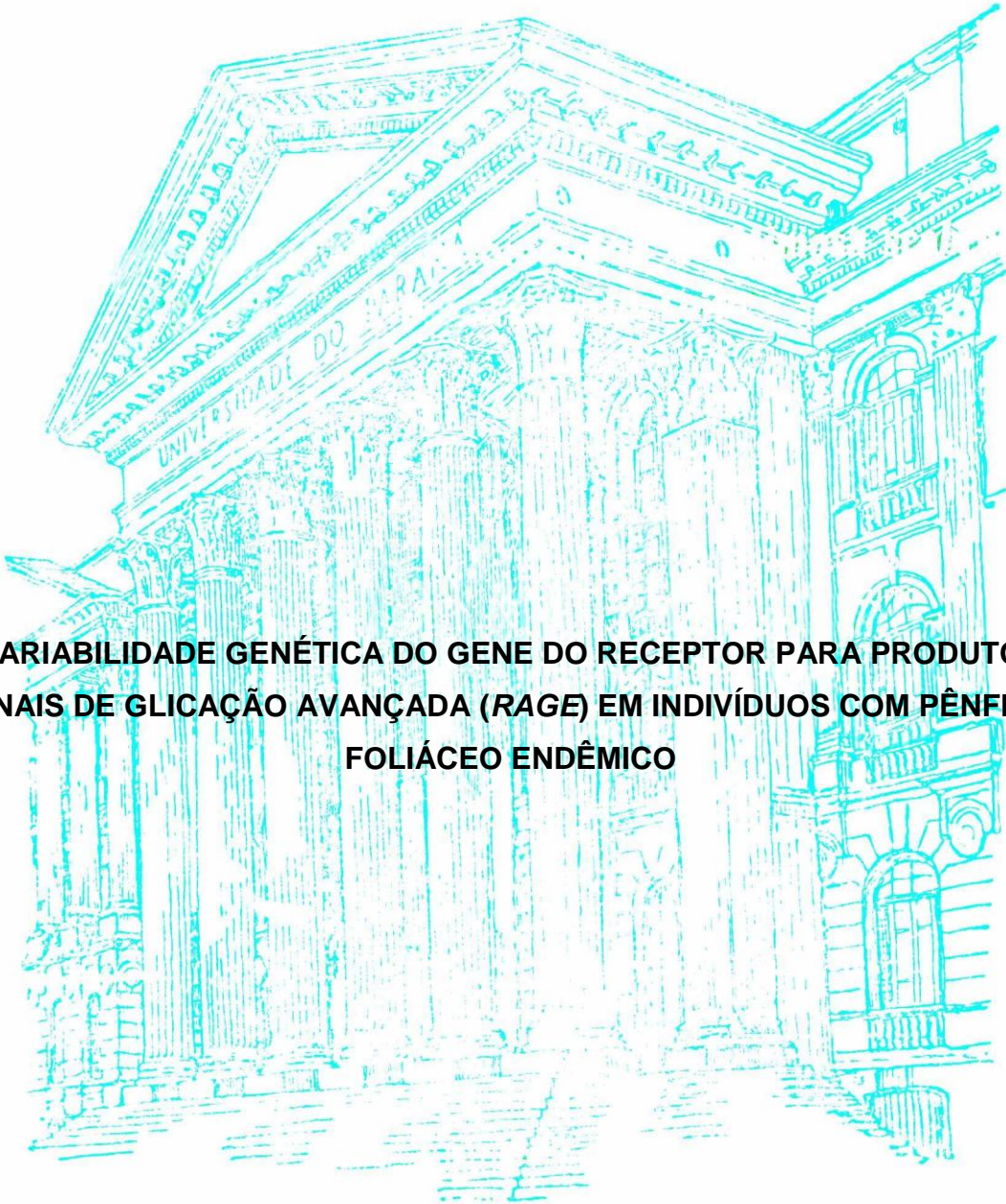


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
MICHELLE DA CUNHA TORRES**



**VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE DO RECEPTOR PARA PRODUTOS  
FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM INDIVÍDUOS COM PÊNFIGO  
FOLIÁCEO ENDÊMICO**

**CURITIBA  
2009**

**MICHELLE DA CUNHA TORRES**

**VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE DO RECEPTOR PARA PRODUTOS  
FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM INDIVÍDUOS COM PÊNFIGO  
FOLIÁCEO ENDÊMICO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Ciências - Bioquímica da  
Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre em Ciências - Bioquímica.**

**Orientador: Emanuel Maltempo de Souza**

**Co-orientadores: Maria Berenice Reynaud  
Steffens**

**Geraldo Picheth**

**CURITIBA**

**2009**

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

## AGRADECIMENTOS

À minha incrível família que sempre fez o possível para me dar o bem mais precioso, uma educação de qualidade. Aos queridos irmãos mais velhos, Eduardo, Janaina e Patrícia, que são um grande exemplo a ser seguido; à Thaminne, irmã que veio na forma de sobrinha. À minha mãe que sempre esteve comigo, zelou pelo meu crescimento e acrescentou muito à minha formação e ao meu “paitrocinador”, grande amigo, uma pessoa genial, e maior modelo de sucesso que eu poderia ter, sempre dando aos filhos muito amor, o necessário e também o extraordinário. À Márcia por cuidar tão bem do meu pai e ao meu irmãozinho Vitor, um guri verdadeiramente inteligente e amoroso.

A todos os professores especiais que passaram pela minha vida e deixaram uma marca especial e que despertaram meu amor pela Ciência. Ao Professor Fábio, que permitiu que eu desenvolvesse uma pesquisa totalmente diferente das tradicionalmente desenvolvidas no laboratório. Aos orientadores, de pesquisa e de vida, Emanuel, Geraldo e Berenice, que tiveram muita paciência, sempre estiveram disponíveis e dispostos, e me impuseram grandes desafios, sem os quais a Ciência perderia o sentido. À Maria Luiza, que além ceder novamente suas amostras, ajudou a direcionar e interpretar as análises com todo o seu conhecimento de Genética, sempre com muita simpatia, interesse e grande disposição. Todos estes são pessoas com sabedoria e experiência inigualável e eu sou uma pessoa de muita sorte por tê-los orientando meus passos.

À Roseli Wassen que me ajudou a iniciar as análises de RT-PCR. À Noemi, que cedeu o termociclador e o espaço no HC para que pudéssemos realizar as análises de RT-PCR. A todas as meninas do HC e especialmente à Ana Lúcia, que me ajudaram muito com o início da RT-PCR e me receberam de braços abertos, sempre com muito bom-humor e simpatia. À Cyntia Picheth por também ter cedido generosamente seu espaço para realização das reações de PCR.

A todo o pessoal do Núcleo, Dona Ju e Valter, pela participação ativa não só neste projeto, fazendo toda a diferença no dia-a-dia do laboratório, e especialmente a Rose Prado, uma pessoa abençoada, dedicada e super amorosa. Ao pessoal do laboratório, que sempre ajuda com dicas, principalmente Ana C., Vânia, Juju Inaba, Gus, Ju Osaki, Marco Antônio, Marco Aurélio, Giovana, Wanderson. Um

agradecimento especial ao Marco Antônio e ao Gus que ajudaram muito mesmo com seus conhecimentos de clonagem e seqüenciamento, sempre com muita disposição. Aos colegas da turma de pós-graduação, que sofreram e aprenderam juntos, principalmente à Tati e ao Arnaldo, pessoas super inteligentes, dedicados e que dividiram mais intensamente esses dias tornando-os muito divertidos.

À turminha de amigos, Juju, Gus, Pati, Ju Osaki e Lizi, uma galerinha do bem, muito maluca, com divertimento garantido e amizade pra levar pra toda a vida. A três gurias incríveis, Juliana, companheira de viagens e amiga pras melhores risadas; à Sarah, mãezona, sempre preocupada, e parceira das diversões; e à Ariane, companheira em todos os momentos da biologia, dos divertidos e dos nem tanto.

Um agradecimento muito especial à Márcia Beltrame, uma pessoa importante que apareceu na minha vida por causa da pesquisa e se tornou uma orientadora no mundo da Genética, e principalmente uma grande e verdadeira amiga, que sempre ajudou imensamente com as amostras, direcionando e interpretando as análises estatísticas e, certamente, também é uma amizade pra levar por toda a vida. Ao pessoal do laboratório LGMH, principalmente Ricardo, Danillo, Gabriel, Dani, Karin Braun e Liana, que sempre foram muito prestativos, divertidos e também ajudaram muito nas análises, dando dicas, em discussões interessantes, artigos...

*Last but definitely not least...* Aos meus dois grandes companheiros de vida, André Gustavo e Mussarelinha, as melhores companhias pra tudo, pacientes nos momentos de estresse, que sempre me lembram da pureza do amor, e que me fazem feliz diariamente só com um olhar. Enfim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram pela minha vida e fizeram a diferença.

Foi o tempo que perdi com a minha  
rosa que a fez tão importante.

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

O pênfigo foliáceo endêmico, também conhecido como fogo selvagem, é uma doença caracterizada por bolhas e mediada por auto-anticorpos específicos contra uma glicoproteína desmossomal, a desmogleína 1 (Dsg1). Esta auto-imunidade resulta em perda da interação entre as células da epiderme, um fenômeno chamado acantólise. Fatores genéticos e ambientais influenciam sua patogênese e principalmente variantes dos genes HLA de classe II têm sido associadas ao pênfigo. A ativação do receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE ou AGER) produz eventos celulares associados a processos inflamatórios e ao diabetes. Mais de 50 polimorfismos foram descritos para o gene *RAGE*, dentre os quais estão os polimorfismos da região promotora, -429 T>C, -374 T>A e 63 bp del (-407\_-345del), todos relacionados a um aumento da expressão de *RAGE*. O polimorfismo 2741 G>A do intron 9 pode estar associado com a geração da isoforma protetora sRAGE através de *splicing* alternativo de *RAGE*. O objetivo deste estudo foi investigar uma possível associação entre os polimorfismos do gene *RAGE*, -429 T>C, -374 T>A, 63 bp del e 2741 G>A, e o desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico através de um estudo caso *versus* controle. Uma amostra da população brasileira subdividida em pacientes (245) e controles (403) foi genotipada através de PCR (63 bp del), PCR-RFLP (-429 T>C) e RT-PCR (-374 T>A e 2741 G>A). Não foram encontradas associações entre os polimorfismos -374 T>A, 63 bp del e 2741 G>A e a doença ( $P>0,05$ ). Por outro lado, foi encontrada uma fraca função protetora do alelo -429C ao pênfigo ( $P=0,04$ ;  $OR=0,61$  [0,34 e 1,07]), que deve ser investigada em estudos usando uma amostra maior. Estudos de haplótipos entre estes polimorfismos revelaram que não há associação entre estes e a doença ( $P>0,05$ ). Entretanto, um forte desequilíbrio de ligação foi encontrado entre os alelos D (63 bp del) e 2741A ( $D' \approx 1,0$ ;  $P<0,0001$ ;  $r^2=0,95$ ), sugerindo que estes podem ser utilizados isoladamente para identificar haplótipos em estudos de associação. Além disso, um estudo de haplótipos entre o polimorfismo -429 T>C do gene *RAGE* e os genes HLA de classe II DRB1 e DQB1 revelaram que -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*04.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 são marcadores de susceptibilidade para o pênfigo, enquanto os haplótipos -429T.DRB1\*07.DQB1\*02, -429T.DRB1\*11.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 estão associados negativamente à doença. Além disso, Euro-Brasileiros mostraram um desequilíbrio de ligação ( $P<0,05$ ) entre os alelos do haplótipo 8.1 AH (-429C, HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02). Finalmente, uma nova mutação (-510\_-509delCT) foi encontrada na região promotora do gene *RAGE*, porém sua baixa frequência (0,26%) aponta para um pequeno efeito populacional, mesmo que estabelecido funcional.

Palavras-chave: MHC, gene *RAGE*, pênfigo foliáceo endêmico, susceptibilidade genética, associação genética.

## ABSTRACT

Endemic *pemphigus foliaceus*, also known as *fogo selvagem* (wild fire), is a blistering skin disease mediated by IgG autoantibodies specific for a desmosomal glycoprotein, desmoglein 1 (Dsg1). This results in detachment of epidermal cells from each other, a process called acantholysis. Genetic and environmental factors are known to influence its pathogenesis and HLA class II genes variants have been associated to susceptibility to *pemphigus*. Activation of the receptor for advanced glycation end products (RAGE or AGER) produces cellular events associated with inflammatory processes and diabetes. Over 50 polymorphisms have been reported for the *RAGE* gene, among which are the promoter region polymorphisms -429 T>C, -374 T>A and 63 bp del (-407\_-345del), all related to increased expression of *RAGE*. The 2741 G>A intron 9 polymorphism may be associated with the generation of the protective isoform sRAGE through alternative splicing of *RAGE*. The aim of this study was to investigate a possible association between *RAGE* polymorphisms, -429 T>C, -374 T>A, 63 bp del and 2741 G>A, and the development of endemic *pemphigus foliaceus* through a case versus control study. A sample of the Brazilian population subdivided in patients (245) and controls (403) was genotyped through PCR (63 bp del), PCR-RFLP (-429 T>C) and RT-PCR (-374 T>A and 2741 G>A). No associations were observed among the polymorphisms -374 T>A, 63 bp del or 2741 G>A and the disease ( $P>0,05$ ). In contrast, the allele -429C was found to be slightly protective to *pemphigus* in this sample ( $P=0.04$ ;  $OR=0.61$  [0.34 e 1.07]) and should be investigated in studies using larger samples. Haplotype studies of these polymorphisms revealed no associations with the disease. However, a strong linkage disequilibrium was found between the alleles D (63 bp del) and 2741A ( $D' \approx 1.0$ ;  $P<0.0001$ ;  $r^2=0.95$ ), suggesting that they can be used as tagSNPs in association studies. Furthermore, haplotype analysis among -429 T>C *RAGE* polymorphism and the HLA class II genes DRB1 and DQB1 revealed that the haplotypes -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*04.DQB1\*03 and -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 are markers for susceptibility to *pemphigus*, while the haplotypes -429T.DRB1\*07.DQB1\*02, -429T.DRB1\*11.DQB1\*03 and -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 are negatively associated to the disease. Additionally, Euro-Brazilians showed linkage disequilibrium among the 8.1 AH alleles -429C, HLA-DRB1\*03 and DQB1\*02. Finally, a new mutation (-510\_-509delCT) was found in the promoter region of *RAGE* however its low frequency (0.26%) indicates that a low population effect is expected, even if established as functional.

Key-words: MHC, *RAGE* gene, endemic *pemphigus foliaceus*, genetic susceptibility, genetic association.



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AB</b>	Afro-Brasileiros
<b>AFGP</b>	1-alkil-2-formil-3,4-diglucosil-pirrol
<b>AGEs</b>	produtos finais de glicação avançada ( <i>Advanced Glycation End Products</i> )
<b>CML</b>	N <sup>ε</sup> -(carboximetil)lisina
<b>CTRL1</b>	Controle de pênfigo
<b>CTRL2</b>	Controle do Sul
<b>CTRL TOTAL</b>	Controle de pênfigo somado ao controle do Sul
<b>CTRL TOTALp</b>	Controle de pênfigo somado ao controle do sul e pareados etnicamente
<b>dbSNP</b>	banco de dados de SNPs ( <i>SNP database</i> )
<b>DMBA/TPA</b>	9,10-dimetilbenz[ <i>a</i> ]antraceno/12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>Dsg 1 e 3</b>	Desmogleína 1 e 3
<b>EB</b>	Euro-Brasileiros
<b>EC (1 a 5)</b>	domínios extracelulares da desmogleína (1 a 5)
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
<b>FFI</b>	2-2(furoil)-4(5)-(2furanil)-1H-imidazol
<b>G, Gly</b>	glicina
<b>IL 1<math>\alpha</math>, 4 e 6</b>	Interleucinas 1 $\alpha$ , 4 e 6
<b>IFI</b>	imunofluorescência indireta
<b>IgG 1, 2, 3 e 4</b>	imunoglobulina G 1, 2, 3 e 4
<b>IgM</b>	imunoglobulina M
<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano ( <i>Human Leucocitary Antigen</i> )
<b>MHC I, II e III</b>	complexo principal de histocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> ) de classes I, II e III
<b>mRNA</b>	ácido ribonucléico mensageiro ( <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	fator nuclear- $\kappa$ B ( <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )

<b>OR</b>	<i>odds ratio</i> (razão de probabilidades)
<b>p38</b>	proteína quinase ativada por mitógeno
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDCD1</b>	molécula 1 de morte celular programada ( <i>programmed cell death 1 molecule</i> )
<b>PF</b>	Pênfigo foliáceo
<b>PFE</b>	Pênfigo foliáceo endêmico
<b>PFEp</b>	Pênfigo foliáceo endêmico pareado etnicamente
<b>PV</b>	Pênfigo Vulgar
<b>RAGE</b>	receptor para produtos finais de glicação avançada ( <i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i> )
<b>RCCX</b>	módulo contendo os genes: RP, complemento C4, CYP21 e TNX
<b>RFLP</b>	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição ( <i>Restriction Fragment-Length Polymorphism</i> )
<b>RT-PCR</b>	reação em cadeia da polimerase com aquisição de dados em tempo real ( <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>S, Ser</b>	serina
<b>SNP</b>	polimorfismo de único nucleotídeo ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>sRAGE</b>	RAGE solúvel ( <i>soluble RAGE</i> )
<b>SSCP</b>	Polimorfismo de conformação de fita simples ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> )
<b>TBE</b>	tampão Tris-Borato-EDTA
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$ ( <i>Tumour Necrosis Factor</i> )
<b>UTR</b>	região não-traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )
<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão celular vascular 1

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	POLIMORFISMOS ANALISADOS E RESPECTIVOS MÉTODOS.....	44
TABELA 2	SISTEMA DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE.....	45
TABELA 3	PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 344 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	46
TABELA 4	SISTEMA DE REAÇÃO DA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DE 344 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE COM A ENZIMA ALUI.....	47
TABELA 5	SISTEMA DA REAÇÃO DE RT-PCR.....	50
TABELA 6	PROGRAMA PARA GENOTIPAGEM POR RT-PCR DOS SNPS .....	50
TABELA 7	SISTEMA DA REAÇÃO DE LIGAÇÃO.....	54
TABELA 8	SISTEMA DE REAÇÃO DA RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM A ENZIMA ECORI .....	56
TABELA 9	SISTEMA DE REAÇÃO DO SEQÜENCIAMENTO.....	57
TABELA 10	PROGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO.....	57
TABELA 11	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	64
TABELA 12	COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	65
TABELA 13	COMPARAÇÃO ENTRE PFE <sub>p</sub> E CTRL TOTAL <sub>p</sub> DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	66
TABELA 14	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	67
TABELA 15	COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL TOTAL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	67
TABELA 16	COMPARAÇÃO ENTRE PFE <sub>p</sub> E CTRL TOTAL <sub>p</sub> DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	68
TABELA 17	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	69
TABELA 18	COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE .....	70
TABELA 19	COMPARAÇÃO ENTRE PFE <sub>p</sub> E CTRL TOTAL <sub>p</sub> DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	71

TABELA 20	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DO INTRON 9 DO GENE RAGE .....	72
TABELA 21	COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE.....	72
TABELA 22	COMPARAÇÃO ENTRE PFE <sub>p</sub> E CTRL TOTAL <sub>p</sub> DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DO INTRON 9 DO GENE RAGE .....	73
TABELA 23	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE RAGE.....	75
TABELA 24	COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE RAGE .....	76
TABELA 25	COMPARAÇÃO ENTRE PFEP E CTRL TOTALP DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE RAGE .....	76
TABELA 26	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A + 63 PB DEL EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE .....	77
TABELA 27	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE .....	77
TABELA 28	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E 2741 G>A EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE.....	77
TABELA 29	HAPLÓTIPOS FORMADOS PELO POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE RAGE E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1 ENTRE PFE-EB E CTRL1-EB.....	79
TABELA 30	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE -429 T>C, HLA-DRB1 E HLA-DQB1 EM PFE-EB.....	80
TABELA 31	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE -429 T>C, HLA-DRB1 E HLA-DQB1 EM CTRL1-EB .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagens de pacientes com PFE.....	23
Figura 2.	Modelo da via imunopatogênica para o desenvolvimento do PFE.....	27
Figura 3.	Mapa de polimorfismos do gene RAGE.....	29
Figura 4.	Localização do polimorfismo 2741 G>A.....	34
Figura 5.	Representação esquemática da estrutura do receptor RAGE.....	35
Figura 6.	Modelo esquemático da formação de AGEs.....	37
Figura 7.	Estrutura química de AGEs.....	37
Figura 8.	Principais efeitos da associação AGE-RAGE.....	40
Figura 9.	Fluxograma mostrando a divisão das amostras.....	42
Figura 10.	Perfil eletroforético do produto de PCR da região promotora (344 pb) de RAGE.....	46
Figura 11.	Clivagem do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene RAGE com a enzima de restrição AluI.....	48
Figura 12.	Perfil eletroforético do polimorfismo -429 T>C.....	49
Figura 13.	Representação gráfica dos resultados da genotipagem do polimorfismo -374 T>A obtidos através de RT-PCR utilizando o sistema TaqMan®.....	51
Figura 14.	Perfil eletroforético de plasmídeos recombinantes após restrição com EcoRI.....	56
Figura 15.	Distribuição das freqüências nas regiões do território brasileiro onde ocorreu início de manifestação das lesões características do pênfigo foliáceo endêmico.....	60
Figura 16.	Distribuição das freqüências da faixa etária de pacientes na qual houve o aparecimento da lesão característica do pênfigo foliáceo endêmico.....	61
Figura 17.	Proporção mulheres:homens nos grupos.....	62
Figura 18.	Distribuição das freqüências das atividades ocupacionais nos grupos.....	63
Figura 19.	Distribuição das freqüências do grau de instrução nos grupos.....	63
Figura 20.	Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento de amostras da região do intron 9, evidenciando o SNP 2741 G>A.....	74
Figura 21.	Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (20:1) do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene RAGE.....	82
Figura 22.	Reação de PCR-SSCP.....	82
Figura 23.	Reação de seqüenciamento do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene RAGE.....	83
Figura 24.	Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento do exon 3 do gene RAGE.....	85
Figura 25.	Alinhamento de parte da seqüência de aminoácidos codificado pelo exon 3 do gene RAGE.....	85

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.....	118
ANEXO II	FICHA DE AVERIGUAÇÃO .....	121
ANEXO III	PRECIPITAÇÃO DE DNA EM ACETATO DE AMÔNIO.....	127
ANEXO IV	RFLP PARA GENOTIPAGEM DO SNP -374 T>A DE RAGE.....	128

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
3.1 DOENÇAS COMPLEXAS .....	20
3.2 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO .....	21
3.2.1 Etiologia .....	21
3.2.2 Quadro Clínico .....	23
3.2.3 Diagnóstico e Tratamento .....	24
3.2.4 Epidemiologia .....	24
3.2.5 Aspectos Ambientais .....	25
3.2.6 Aspectos Genéticos .....	27
3.3 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA .....	28
3.3.1 O gene RAGE .....	28
3.3.2 Polimorfismos de RAGE .....	29
3.3.3 Estrutura do Receptor RAGE .....	34
3.3.4 Ligantes de RAGE .....	36
3.4 EFEITOS DA ATIVIDADE DO RECEPTOR RAGE .....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL .....	41
4.1.1 Grupo de Portadores de Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE) .....	42
4.1.2 Grupo Controle Total (CTRL TOTAL) .....	42
4.1.3 Amostra pareada etnicamente .....	43
4.1.4 Dados das amostras .....	43
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA .....	44
4.3 GENOTIPAGEM .....	44
4.3.1 Genotipagem do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene RAGE .....	45
4.3.2 Genotipagem do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene RAGE .....	47
4.3.3 Genotipagem dos polimorfismos -374 T>A da região promotora e 2741 G>A do intron 9 do gene RAGE .....	49
4.4 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES E CONFIRMAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO 2741 G>A .....	52
4.4.1 Polimorfismo de conformação de fita simples ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> ou SSCP) do produto de PCR da região promotora do gene RAGE .....	52
4.4.2 Clonagem de produtos de PCR .....	53
4.4.3 Mini-preparação de plasmídeo .....	55
4.4.4 Seqüenciamento .....	57
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	58
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>60</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	60
5.2 GENOTIPAGEM .....	64
5.2.1 Análise de associação individual do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene RAGE .....	64

5.2.2	Análise de associação individual do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene RAGE .....	66
5.2.3	Análise de associação individual do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del da região promotora do gene RAGE .....	68
5.2.4	Análise de associação individual do polimorfismo 2741 G>A do intron 9 do gene RAGE .....	71
5.3	ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE RAGE .....	75
5.4	ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE RAGE E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1 .....	78
5.5	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES.....	81
5.5.1	Polimorfismo de conformação de fita simples ( <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> ou SSCP) do produto de PCR da região promotora do gene RAGE .....	81
5.5.2	Clonagem e seqüenciamento do produto de PCR da região promotora do gene RAGE .....	83
5.5.3	Clonagem e seqüenciamento do produto de PCR da exon 3 do gene RAGE ..	84
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
6.1	AMOSTRA POPULACIONAL.....	88
6.1.1	Composição da amostra .....	88
6.1.2	Caracterização da amostra .....	89
6.2	GENOTIPAGEM .....	90
6.2.1	Análise de associação individual do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene RAGE .....	91
6.2.2	Análise de associação individual do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene RAGE .....	92
6.2.3	Análise de associação individual do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del da região promotora do gene RAGE.....	93
6.2.4	Análise de associação individual do polimorfismo 2741 G>A do intron 9 do gene RAGE .....	95
6.3	ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE RAGE .....	96
6.4	ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE RAGE E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1 .....	98
6.5	DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES.....	101
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>118</b>



## 1. INTRODUÇÃO

No início do século XX, o monge Gregor Mendel postulou as leis dos padrões de herança genética baseado em seus estudos de cruzamento em plantas, dando início à Genética Moderna e à compreensão das bases genéticas de doenças de origem monogênica (Risch, 2000). Contudo, doenças de caráter multifatorial como o diabetes, a artrite reumatóide e o pênfigo foliáceo resultam da interação do produto de vários genes com diversos fatores ambientais, tornando muito complexa a elucidação de sua etiologia (Price et al., 1999).

Pênfigo foliáceo endêmico (PFE), também conhecido como fogo selvagem, é uma doença auto-imune mediada por auto-anticorpos IgG específicos para a desmogleína 1, uma glicoproteína desmossomal (Amagai, 1995), e se caracteriza por bolhas e erosões na pele resultantes de um processo chamado acantólise (Veldman e Feliciani, 2007). O pênfigo foliáceo ocorre globalmente de forma esporádica, no entanto, na América do Sul ocorre de forma endêmica em áreas rurais principalmente no Centro-Oeste do Brasil (Hans-Filho et al., 1999).

O estudo dos fatores genéticos envolvidos com doenças multifatoriais como o PFE é feito através de estudos caso *versus* controle de variantes de genes candidatos. Estes estudos têm indicado que a susceptibilidade e resistência ao PFE estão associadas a vários alelos dos genes HLA, integrantes do complexo principal de histocompatibilidade classes I e II (MHC I e II) (Pavoni et al. 2003).

O receptor RAGE ou AGER (receptor para produtos finais de glicação avançada), membro da superfamília das imunoglobulinas, é codificado pelo gene *RAGE* localizado no cromossomo 6p21.3 no MHC classe III, posicionado entre MHC classes I e II (Sugaya et al., 1994). Estudos revelaram a presença de um alelo de *RAGE* num haplótipo que inclui alelos HLA, designado haplótipo ancestral 8.1 (8.1 AH), que está associado a doenças auto-imunes (Laki et al., 2007).

Através da interação com ligantes, como os produtos finais de glicação avançada (AGEs), RAGE ativa vias pró-inflamatórias e pró-coagulantes, além de gerar estresse oxidativo (Nagaraj et al., 1996; Miyata et al., 1997). Sua expressão é aumentada em locais de acúmulo dos seus ligantes, bem como em estresse, desenvolvimento normal, diabetes, insuficiência renal, resposta inflamatória e na doença de Alzheimer (Yan et al., 1996; Nishikawa et al., 2000; Schmidt e Stern, 2000; Hudson et al., 2002).

Até o momento, cerca de 50 polimorfismos já foram identificados no gene *RAGE*. Na região promotora foram encontrados os polimorfismos funcionais -429 T>C (rs1800625), -374 T>A (rs1800624) e uma deleção de 63 pb (-407\_-345del) que estão associados à alteração da transcrição de *RAGE in vitro* (Hudson et al.; 2001). Estudos recentes têm mostrado a participação do receptor RAGE na inflamação intestinal (Andrassy et al., 2006; Raman et al., 2006) e no desenvolvimento de câncer de pele induzido por DMBA/TPA (Gebhardt et al., 2008).

O *splicing* alternativo do mRNA de *RAGE* gera uma isoforma solúvel (sRAGE) que conserva parte do intron 9. Esta forma truncada de RAGE é resultado da introdução de um códon de parada prematuro no mRNA resultando na eliminação das regiões codificadas pelos exons 10 e 11. No produto da tradução, esta região corresponde à hélice transmembrana, que ancora o receptor na membrana, e à cauda citosólica, responsável pela transdução de sinal intracelular (Schmidt et al., 1994; Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005). O sRAGE é uma isoforma com provável ação supressora da ativação e sinalização de RAGE, pois é capaz de ligar e seqüestrar ligantes de RAGE sem promover a transdução de sinal (Ding e Keller, 2005). O SNP 2741 G>A (rs2071288) localiza-se no intron 9 próximo ao exon 10, numa região de interação com proteínas reguladoras de *splicing* (item 3.3.2; Stamm et al., 2005; Blaustein et al., 2007), podendo estar associado à geração da isoforma protetora sRAGE através de *splicing* alternativo do mRNA.

Uma vez que o produto do gene *RAGE* é parte importante do processo inflamatório e seus diferentes alelos estão associados a condições patológicas e suas complicações, além de também estar próximo de outros genes associados ao PFE, este gene foi escolhido como candidato para estudar uma possível associação com a predisposição ao PFE. O estudo das variantes alélicas pode contribuir para a identificação de fatores responsáveis pela susceptibilidade ou proteção ao PFE, e desenvolvimento de novas terapias e medidas preventivas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis associações entre variantes genéticas do gene do receptor para os produtos finais de glicação avançada (*RAGE*) e o pênfigo foliáceo endêmico em uma população brasileira.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características epidemiológicas do pênfigo foliáceo endêmico na população estudada;
- Determinar a variabilidade genética nos sítios polimórficos da região promotora de *RAGE*, -429 T>C, -374 T>A e 63 pb del (-407\_-345pb), e do intron 9, 2741 G>A, em estudo tipo caso *versus* controle (pacientes com pênfigo foliáceo endêmico *versus* grupo controle saudável);
- Amplificar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) a região promotora do gene *RAGE* para determinar a frequência do polimorfismo 63 pb del através de eletroforese em gel de agarose;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo -429 T>C da região promotora através da reação de PCR-RFLP;
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos -374 T>A da região promotora e 2741 G>A do íntron 9 através de PCR com aquisição de dados em tempo real (PCR em Tempo Real) utilizando o sistema TaqMan®;
- Determinar as frequências haplotípicas e o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do gene *RAGE* em estudo;
- Realizar uma análise haplotípica e determinar o desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE* e as variantes dos genes HLA-DRB1 e DQB1;
- Comparar as frequências genotípicas, alélicas, de portadores e haplotípicas dos polimorfismos em estudo entre os grupos de pacientes e de indivíduos controle.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DOENÇAS COMPLEXAS

As doenças podem ser classificadas de acordo com a contribuição relativa dos fatores genéticos e ambientais para a sua etiologia. Em geral, estes fatores interagem para desencadear a doença, mas com contribuições diferenciadas. Nos distúrbios monogênicos o papel dos fatores genéticos é predominante e incontestável, uma vez que os padrões genealógicos mendelianos são consistentes (Strachan e Read, 2002). As causas de patologias de padrão de herança monogênico como a hemofilia e a distrofia muscular de Duchenne têm sido elucidadas pela identificação dos genes que as controlam (Petronis, 2001). No entanto, doenças que não seguem os padrões mendelianos de herança surgem da interação de vários genes, fatores ambientais e comportamentos de risco e são conhecidas como doenças complexas ou multifatoriais dentre as quais se destacam as doenças auto-imunes, mentais e neurodegenerativas (Kibertis e Roberts, 2002).

Ao contrário do padrão de herança monogênico no qual o gene mutado em dose simples ou dupla é suficiente, a manifestação de doenças multifatoriais envolve susceptibilidade genética. Dessa forma um indivíduo geneticamente susceptível pode manifestar a doença ou não, dependendo da combinação do seu genótipo com fatores de risco como ambiente, idade, sexo e alimentação. A constituição genética que aumenta ou diminui o risco de desenvolvimento das doenças multifatoriais resulta de um grande número de variantes polimórficas com baixa penetrância, ou seja, as variantes exercem pequeno efeito fenotípico (Willett, 2002). Para identificar alelos que conferem um baixo risco relativo têm sido utilizadas principalmente as análises de associação caso *versus* controle. Neste tipo de análise as frequências alélicas e genotípicas de genes candidatos a predispor a doença são comparadas entre pacientes e indivíduos saudáveis (Risch e Merikangas, 1996).

As causas da maioria das doenças complexas ainda são pouco conhecidas, o que torna sua elucidação mais difícil. Assim sendo, é de grande importância a identificação dos fatores genéticos que contribuem para esse processo, visto que este conhecimento pode auxiliar não só no desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento, mas também auxiliam no entendimento da etiologia da doença e,

conseqüentemente, podem permitir novos métodos de diagnóstico e prevenção (Petzl-Erler, 1999).

Muitas das doenças complexas são atribuídas a disfunções auto-imunes, como pênfigo foliáceo e vulgar, artrite reumatóide e diabetes tipo 1. Doenças auto-imunes são condições crônicas que se caracterizam pelo ataque do sistema imune a um ou mais órgãos próprios e afetam aproximadamente 5% da população (Becker et al., 1998). Os mecanismos envolvidos na auto-imunidade ainda são pouco conhecidos, mas a participação de um componente genético é demonstrada pela agregação familiar das doenças, o que significa que há um risco maior de um consangüíneo apresentar a patologia em relação a outros indivíduos (Strachan e Read, 2002).

## 3.2 PÊNFIGO FOLIÁCEO ENDÊMICO

### 3.2.1 Etiologia

Pênfigo é o nome dado a um grupo de doenças auto-imunes raras caracterizadas pela produção de auto-anticorpos contra moléculas de adesão celular expressas na superfície de queratinócitos, as desmogleínas (Amagai, 1995), resultando no aparecimento de vesículas intra-epidérmicas (Veldman e Feliciani, 2007).

O pênfigo vulgar (PV) e o pênfigo foliáceo (PF) são os principais tipos clínicos da doença, sendo os auto-antígenos reconhecidos por auto-anticorpos IgG, a desmogleína 3 (Dsg3) e a desmogleína 1 (Dsg1) respectivamente (Miyagawa et al., 1999). A Dsg1, expressa principalmente nas células da camada subcórnea da epiderme, é reconhecida no PF pelos auto-anticorpos IgG específicos, causando um fenômeno chamado acantólise, no qual ocorre lise das junções intercelulares do epitélio escamoso. No espaço formado pela perda da adesão das células formam-se as bolhas intraepidérmicas. A Dsg 3 é principalmente expressa nas células da camada suprabasal da epiderme, que é mais interna, e nas mucosas. Portanto, a auto-imunidade contra Dsg3 gera lesões mais profundas no PV (Chidgey, 1997). Outra forma imunológica menos comum é o pênfigo paraneoplásico que está

associado a tumores e no qual, além das Dsg 1 e 3, as proteínas plaquinas são alvos dos auto-anticorpos. Nesta forma de pênfigo são observadas lesões na pele e mucosas (Martel et al., 2003).

No pênfigo foliáceo, os anticorpos depositados sobre os queratinócitos são principalmente da classe IgG, particularmente da subclasse IgG4, com títulos menores de IgG1, IgG2, IgG3 e IgM (Tremeau-Martinage et al., 1995). Também podem ser detectados anticorpos circulantes que incluem IgG4, IgG1, e raramente IgG3 (Jones et al., 1988). A recuperação dos pacientes geralmente está correlacionada com o declínio dos títulos de IgG4, enquanto os títulos de IgG1 muitas vezes permanecem detectáveis, corroborando o papel patogênico dos anticorpos IgG4 (Bhol et al., 1994).

O papel dos auto-anticorpos no desenvolvimento do pênfigo foliáceo está bem estabelecido, no entanto, o mecanismo molecular da acantólise permanece controverso e sob intensa investigação. Entre as hipóteses em estudo, encontram-se impedimento estérico, atividade proteolítica, transdução de sinal no queratinócito, endocitose da desmogleína, síntese alterada ou degradação de proteínas desmossomais e apoptose (Dasher et al., 2008).

Dasher et al. (2008) sugerem o envolvimento de múltiplos mecanismos. O evento inicial, a ligação entre IgG patogênico e a Dsg alvo, geraria uma transição estrutural na proteína alvo. A natureza dessa modificação estrutural permanece desconhecida, mas pode ser derivada de impedimento estérico, no qual a ligação entre Dsg e anticorpo anti-Dsg causariam um impedimento da interação entre proteínas desmossomais, ou ainda derivada de ruptura de interações entre proteínas desmossomais, ou mudanças conformacionais da Dsg. Esta modificação estrutural resultaria em aumento da fosforilação pela quinase p38 (proteína quinase ativada por mitógeno) desencadeando uma cascata de eventos celulares (Dasher et al., 2008). Finalmente, a ruptura de interações moleculares e da face citoplásmica dos desmossomos, colapso do citoesqueleto, endocitose da Dsg, apoptose e outros eventos intracelulares, ocorreriam seqüencialmente ou agiriam sinergicamente, resultando em perda da adesão celular.

### 3.2.2 Quadro Clínico

As lesões primárias características do pêfingo foliáceo endêmico são bolhas superficiais que podem se transformar em discretas erosões, escama fina e aderente ou em pequena crosta hemorrágica. Comumente as bolhas possuem bactérias que com o rompimento e ressecamento deixam escamas e crostas amareladas (Hans-Filho et al., 1999).

Campbell et al. (2001) citam três formas clínicas do PF: a localizada, a generalizada e a hiperpigmentada. Na forma localizada as lesões são limitadas às áreas seborréicas da pele, sendo normalmente pequenas bolhas que quando se rompem causam erosões deixando a área eritematosa, violácea ou com pápulas.

O pêfingo foliáceo generalizado pode apresentar-se nas formas: (1) bolhosa-esfoliativa, doença aguda, com lesões bolhosas e ausência de septicemia ou bacteremia; (2) eritroderma-esfoliativo, com erosões superficiais confluentes, crostosas, e com exsudato sérico, infecções secundárias podem também ser observadas; e (3) placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares.

A forma hiperpigmentada está associada à remissão da doença, podendo restringir-se a áreas de lesões antigas ou se difundir para áreas não afetadas anteriormente (Campbell et al., 2001). A Figura 1 destaca pacientes com PFE.



Figura 1. Imagens de pacientes com PFE. Em destaque o aspecto das lesões em portadores de PFE. Fonte: Imagens cedidas pelo Mestrando Danilo G. Augusto (LGMH).

### 3.2.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico é baseado em observações clínicas, histológicas e imunológicas. A acantólise é detectada por exames histológicos e a elevada concentração de auto-anticorpos do tipo IgG é detectada por imunofluorescência indireta no soro de pacientes (IFI) (Campbell et al., 2001). A diferenciação entre PV e PF pode ser feita pela observação de lesões orais (mucosas), encontradas somente em indivíduos acometidos por PV.

O tratamento é feito com glicocorticóides administrados por via oral sendo a prednisona a droga mais usada; a dosagem depende da gravidade das lesões e é reduzida com a melhora do quadro clínico. Por demandar um tratamento prolongado podem surgir efeitos colaterais como o desenvolvimento de infecções intestinais, extracutâneas e urinárias, pneumonia, tuberculose e septicemias. Além disso, hipertensão, hiperglicemia, aumento de peso, osteoporose, gastrite, úlcera gastrintestinal e surtos psicóticos podem surgir durante o tratamento. Os pacientes devem ainda proteger-se da luz solar que pode induzir a formação de bolhas, sendo o sol um fator ambiental dos mais importantes no desenvolvimento e agravamento do PFE (Campbell et al., 2001). Banhos de permanganato de potássio (diluição de 1/40.000) são usados para promover a cicatrização e reduzir a sensação de ardência causada pelas lesões (Harman e Black, 1999; Campbell et al., 2001).

### 3.2.4 Epidemiologia

O pênfigo foliáceo é encontrado sob as formas: esporádica e endêmica. O pênfigo foliáceo ocorre na América do Norte, Europa, e em áreas não endêmicas da América do Sul. A forma endêmica ocorre principalmente na América do Sul incluindo países como Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (Petzl-Erler e SantaMaria, 1989) e também na Tunísia (Bastuji-Garin et al., 1995).

As características clínicas, histológicas e imunológicas são semelhantes entre as formas do PF, mas as epidemiológicas não. Na França, a incidência é de 1,7 casos por milhão por ano, destes casos, 73% correspondem ao PV, a incidência aumenta com a idade, e a proporção sexual de afetados corresponde a 2 mulheres:1 homem. Na Tunísia a incidência é de 6-7 casos por milhão por ano. A maioria dos



casos, 61%, corresponde ao PF, a proporção de mulheres para homens afetados é de 4:1 e a taxa de incidência é maior entre mulheres jovens (Bastuji-Garin et al., 1995). Já no Brasil o PF é o mais comum com uma incidência de 25-35 casos por milhão por ano.

No Brasil, o pênfigo foliáceo é endêmico nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. A maioria dos casos ocorre em regiões com altitude entre 500 e 800 metros, próximas a rios acometendo trabalhadores rurais e indígenas (Lombardi et al., 1992; Campbell et al., 2001). Frequentemente aparece em crianças e jovens com pico de incidência entre 20 e 30 anos de idade. A proporção sexual de afetados é de 1:1 (Diaz et al., 1989).

No final da década de 80, o pênfigo foliáceo passou a ser chamado de pênfigo foliáceo endêmico (PFE) no Brasil, onde também é conhecido como fogo selvagem. O endemismo torna esta patologia peculiar, pois é a única doença que é ao mesmo tempo auto-imune e endêmica (Campbell et al., 2001).

### 3.2.5 Aspectos Ambientais

A partir da metade da década de 70, a endemia reduziu muito principalmente em São Paulo e Paraná, e atualmente está estabilizada em alguns focos. A ascensão e a queda da endemia do PFE coincidem com a trajetória do desbravamento e ocupação do território brasileiro (Campbell et al., 2001).

A endemia gerou suspeita de que algum fator ambiental pudesse estar contribuindo para o desenvolvimento do PFE. Warren et al. (2000) sugeriram que um fator ambiental desencadeador da doença ocorre na área endêmica pois os títulos de anticorpos anti-Dsg1 em indivíduos saudáveis elevam-se com a proximidade da residência destes com a área endêmica na reserva de Limão Verde (Amambaí, MS), na qual vivem os indígenas Terena. A picada de um mosquito hematófago da família *Simuliidae* parece ser o único fator ambiental comum entre os pacientes analisados por Lombardi et al. (1992). Especula-se que alguma molécula ou vírus de sua saliva seria o responsável por desencadear a auto-imunidade através de uma reação-cruzada. Em um levantamento feito em 1998, descobriu-se que a distribuição de uma única espécie de simulídeos, *Simulium nigrimanum*, é coincidente com os locais de foco da doença (Eaton et al., 1998).

Os altos títulos de anticorpos anti-Dsg em indivíduos saudáveis de Limão Verde levaram Li et al. (2003) a um estudo que concluiu que algum antígeno salivar desses insetos pode conter uma molécula que reage de forma cruzada com a Dsg1 e desencadeia uma resposta não-patogênica de auto-anticorpos anti-EC5, o quinto domínio extracelular da Dsg1. Esta região, que é muito pequena e próxima à membrana (Figura 2), pode estar oculta *in vivo* e, conseqüentemente, é incapaz de ser reconhecida por anticorpos circulantes anti-EC5. Os pacientes que desenvolvem PFE seriam indivíduos geneticamente predispostos que, através do fenômeno chamado espalhamento intramolecular de epítomos, produziram uma resposta patogênica de anticorpos contra os primeiro (EC1) e segundo (EC2) domínios extracelulares da Dsg1. Os domínios EC1 e EC2 (Figura 2) são os responsáveis pela função de adesão das desmogleínas e quando reconhecidos pelos auto-anticorpos possivelmente perdem a capacidade de mediar a adesão celular desencadeando o pênfigo foliáceo endêmico.

O espalhamento de epítomos é uma resposta auto-reativa específica de células B ou T aos epítomos endógenos, que são distintos dos epítomos desencadeadores da doença. Estes epítomos podem ser derivados da proteína reconhecida inicialmente ou de proteínas secundárias, sendo reconhecidos durante uma resposta inflamatória ou em caso de auto-imunidade crônica (Vanderlugt e Miller, 2002).

Diaz et al. (2004) mostraram que um número significativo de pacientes com doenças transmitidas por vetores hematófagos como oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas, também possuem auto-anticorpos anti-EC5. Este modelo proposto por Li et al. (2003) explica porque pacientes com oncocercose, leishmaniose e doença de Chagas não têm pênfigo, mesmo portando anticorpos anti-EC5, e também pode explicar porque muitos indivíduos saudáveis e parentes consangüíneos de pacientes possuem anticorpos anti-Dsg1 e não desenvolvem a doença.

Outros aspectos ambientais menos estudados como a nutrição podem estar associados ao desencadeamento do PFE, além da existência de causas endógenas como o perfil genético.

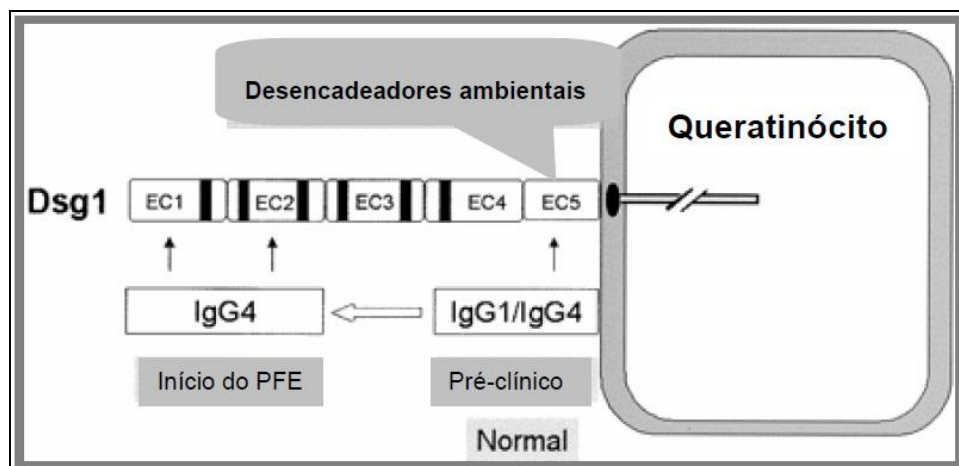


Figura 2. Modelo da via imunopatogênica para o desenvolvimento do PFE. Fatores ambientais desencadeiam a produção de anticorpos IgG1 e IgG4 que desencadeiam resposta não-patogênica contra o domínio EC5 da Dsg1. Em indivíduos geneticamente predispostos, o espalhamento intramolecular de epítomos resulta na geração de anticorpos IgG4 contra os domínios EC1 e EC2, o que induz a doença. Fonte: adaptado de Li et al. (2003).

### 3.2.6 Aspectos Genéticos

A participação de um componente genético na patogênese do PFE é evidenciada pela sua agregação familiar. O número de casos da doença entre indivíduos geneticamente relacionados é muito superior ao de indivíduos com ligações apenas sociais, mesmo nas regiões endêmicas (Hans-Filho et al., 1999). E a associação de genes HLA (antígeno leucocitário humano) do MHC (o complexo principal de histocompatibilidade) é comumente investigada em doenças auto-imunes, devido à alta variabilidade no sítio de ligação que define a afinidade do peptídeo que está sendo apresentado e, portanto, a capacidade de um indivíduo gerar uma resposta imune a um antígeno, sendo ele estranho ou próprio (Todd, 1999).

Ao investigar uma população brasileira caucasóide em um estudo pioneiro, Petzl-Erler e SantaMaria (1989) concluíram que a predisposição ao PFE estaria principalmente associada a alelos HLA do MHC de classe II, sendo os haplótipos DR1.DQw1 e DR4.DQw3 marcadores de susceptibilidade, e os haplótipos DR7.DQw2 e DR3.DQw2, marcadores de resistência a PFE. Outros estudos associam PFE aos alelos HLA DRB1\*01, \*04 e \*14 (Moraes et al., 1991). Estudos em uma população japonesa (Cerna et al., 1993) encontraram associação da doença com os alelos HLA-DR4 e DR14.

As associações com os alelos HLA-DR1 e DR4 foram corroboradas pelo estudo de Pavoni et al. (2003) que também detectou associações positivas com os alelos DRB1\*0101, \*0103, \*0406, \*0410, \*1406 e \*1601, além de associações negativas com DRB1\*0301, \*08 (especialmente \*0801) e \*11 (\*1101 e \*1104). Em populações indígenas (Terena e Xavantes) somente DRB1\*0404 foi associado com PF, e DRB1\*08 em associação negativa. Estudos com PF esporádico revelaram associações com os alelos DRB1\*0102 e \*0404 em europeus (Moiseu et al., 2000), e com \*1401, \*1405 e \*0406 em asiáticos (Miyagawa et al., 1999). As discordâncias nos resultados das associações podem ser resultantes de diferenças da variabilidade dos genes HLA entre as populações, já que associações não detectadas em determinado grupo étnico podem ser explicadas pela ausência ou baixa frequência dos alelos correspondentes nesta população (Pavoni et al., 2003).

Também foram detectadas associações entre os polimorfismos -590 C>T da interleucina 4 e -174 G>C da interleucina 6 e o PFE. Foi encontrada associação positiva com o genótipo TT (OR=2,71) e associação negativa com o alelo C (OR=0,13) de IL4, além de associação negativa do genótipo CC (OR=0,13) e associação positiva de portadores do alelo G (OR=7,66) em IL6 (Pereira et al., 2004). As interleucinas são moléculas críticas no controle e modulação das respostas imunes. Cabe destacar os resultados obtidos para as variantes genéticas do auto-antígeno DSG1, visto que os polimorfismos 809 C>T e 1660 G>A não estão associados ao PFE (Malheiros, 2003).

Braun-Prado e Petzl-Erlar (2007) encontraram uma fraca associação entre o PFE e o alelo PD1.6A do gene PDCD1 (programmed cell death 1 molecule) em Euro-Brasileiros. O gene PDCD1 pertence à família CD28 de receptores e participa da indução e manutenção da tolerância periférica (Braun-Prado e Petzl-Erlar, 2007).

### 3.3 RECEPTOR PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA

#### 3.3.1 O gene *RAGE*

O gene do receptor para os produtos finais de glicação avançada (*RAGE: Receptor for Advanced Glycation End Products*) humano foi mapeado no

cromossomo 6p21.3, no MHC de classe III (Sugaya et al., 1994, GenBank/EMBL Data Bank Accession Number D28769).

Este gene é composto por 11 exons e 10 introns e já foram identificados cerca de 50 polimorfismos nas seqüências de DNA da região promotora, exons, introns e regiões 5'- e 3'-UTR (não-traduzida) do gene *RAGE*. A Figura 3 mostra as principais variantes descritas para o gene *RAGE*.

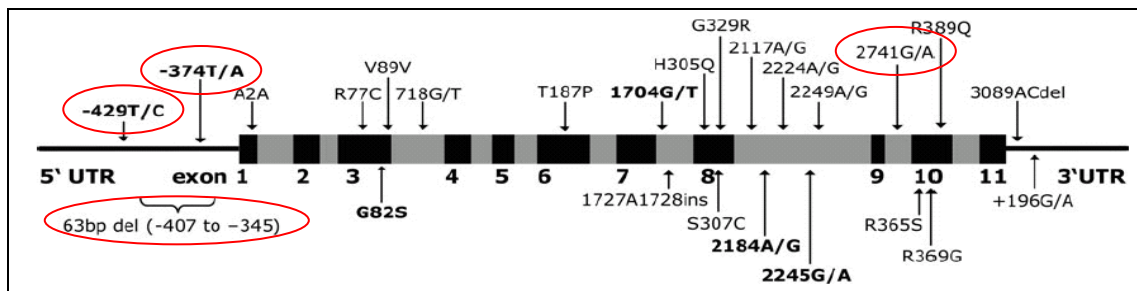


Figura 3. Mapa de polimorfismos do gene *RAGE*. As variantes mais comuns estão marcadas em negrito; os polimorfismos analisados neste estudo estão destacados por círculos. Fonte: adaptado de Kanková et al. (2005).

### 3.3.2 Polimorfismos de *RAGE*

Vários estudos indicam um possível efeito dos polimorfismos do gene *RAGE* como mediadores de função alterada do receptor, associando-os às complicações micro-vasculares e macro-vasculares do diabetes (Ding e Keller, 2005). Contudo, em sua maioria, os polimorfismos de *RAGE* são responsáveis por alterações de baixa freqüência em regiões codificadoras ou ainda estão localizados em regiões não-codificadoras (Poirier et al., 2001). Este pode ser o motivo de a maioria dos estudos de associação que investigam a relação entre os polimorfismos de *RAGE* e complicações do diabetes, apresentarem ainda resultados negativos ou controversos.

Além da baixa freqüência de polimorfismos do gene *RAGE* outras hipóteses foram levantadas para explicar a divergência entre os resultados de associação com doenças como o diabetes e suas complicações. Estas hipóteses incluem as diversas origens das populações chamadas Caucásicas (Inglaterra, Eslovênia, Finlândia, China, Itália, França, entre outros), diversidade de etnias nos estudos, diferenças de expressão do gene *RAGE* *in vitro* e *in vivo* (Rudofsky et al., 2004), desequilíbrio de ligação entre os alelos -429C e -374A ou entre os polimorfismos do gene *RAGE* e

regiões adjacentes ou próximas que conferem susceptibilidade ou proteção às complicações do diabetes (Santos et al., 2005).

Apesar das discrepâncias entre os estudos, variações no exon 3, região que codifica o sítio de interação ligante-receptor, ou em regiões responsáveis pela regulação da expressão de *RAGE*, como o promotor, têm sido alvos importantes das pesquisas porque podem alterar a concentração e atividade do receptor *RAGE* (Hudson et al. 2002). Estudos de freqüências destes polimorfismos do gene *RAGE* têm se mostrado os mais promissores em associações com doenças onde existe um componente imunológico e inflamatório importante.

Hudson et al. (2001) identificaram a repetição de três nucleotídeos (GGT)<sub>n</sub> na posição -1420 e as substituições -1393 G>T, -1390 G>T, -1202 G>A, -429 T>C, -374 T>A além do polimorfismo 63 pb del (deleção da região -407\_-345del) na região promotora de *RAGE*; estes autores também detectaram a substituição +20 T>A na região 5'-UTR. Destes, foi demonstrado que os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e 63 pb del alteram a expressão do gene *RAGE*. Em outro trabalho, Hudson et al. (1998) descreveram nove polimorfismos do gene *RAGE*, sete localizados nos exons e dois nos introns. Entre estes polimorfismos, quatro geram troca de aminoácidos: G82S (exon 3), T187P (exon 6), G329R (exon 8) e R389Q (exon 10), mas apenas o polimorfismo G82S (exon 3) foi encontrado em freqüência expressiva, com a freqüência do alelo raro de no mínimo 3%.

A transição 2184 A>G no intron 8 pode estar situada no sítio de interação com proteínas reguladoras do *splicing*, e foi associada ao estado antioxidante de pacientes diabéticos (Kanková et al., 2001). Em um estudo posterior, Kanková et al. (2005) encontraram ainda uma maior freqüência do alelo 2184G em um grupo de diabéticos com nefropatia.

Yoshioka et al. (2005) não encontraram relação entre o polimorfismo 1704G>T e microalbuminúria (estágio inicial de nefropatia) em japoneses diabéticos tipo 2. Estes resultados divergem daqueles encontrados por Matsunaga-Irie et al. (2004) que observaram uma fraca relação entre 1704G>T e nefropatia em japoneses diabéticos tipo 2, o que pode ser devido à pequena amostra analisada pelos últimos. Este polimorfismo ocorre no intron 7 de *RAGE*, e ainda não foi determinado se ele apresenta algum efeito funcional.

Recentemente, Rudofsky et al. (2004) descreveram uma redução do risco de desenvolvimento de nefropatia em diabéticos associada à presença do polimorfismo 63 pb del da região promotora em pacientes com diabetes tipo 2. Este polimorfismo está associado a um aumento da expressão gênica de *RAGE* em indivíduos com esta deleção (Hudson et al., 2001).

De acordo com Hudson et al. (2002), o polimorfismo -429T>C da região promotora de *RAGE* não está associado com isquemia cardíaca, tanto em diabéticos quanto em não diabéticos, porém foi observada associação do alelo -429C com retinopatia em diabéticos tipo 2 (Hudson et al., 2001; Hudson et al., 2004). Kanková et al. (2005) encontraram associação entre o alelo -429C e nefropatia em pacientes diabéticos. Por outro lado, Santos et al. (2005) não encontraram associação dos polimorfismos -429 T>C e 63 pb del com retinopatia, nefropatia e isquemia cardíaca em pacientes diabéticos tipo 2 caucasóides e Afro-Brasileiros. Dados reportados por Hudson et al. (2001) mostraram que a presença do alelo -429C causa um aumento da atividade transcricional do promotor em duas vezes quando comparado com o alelo -429T.

Em estudo recente, Schenk et al. (2001) relataram que o alelo -374A do polimorfismo -374 T>A da região promotora de *RAGE* está associado com aumento da frequência de câncer de células pulmonares não-pequenas (*non-small cell lung cancer*). No entanto, Hudson et al. (2004) não observaram associação entre este polimorfismo e isquemia cardíaca em diabéticos e não diabéticos, bem como com retinopatia em diabéticos.

Pettersson-Fernholm et al. (2003) investigaram os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e G82S em finlandeses diabéticos tipo 1, e os resultados indicaram que o genótipo -374AA tem efeito protetor contra o desenvolvimento de doença coronariana, além de uma associação do polimorfismo -374 T>A com nefropatia nestes indivíduos. Entretanto, Poirier et al. (2001) não encontraram esta associação quando estudaram franceses com diabetes tipo 1.

Santos et al. (2005) reportaram uma associação do alelo -374A com a redução do risco de isquemia em diabéticos tipo 2 Afro-Brasileiros. Em concordância com estes resultados, Falcone et al. (2004) mostraram que indivíduos com o genótipo -374AA tem uma menor susceptibilidade à doença arterial coronariana. A substituição T>A na posição -374 da região promotora provoca a modificação de um

sítio de ligação a um complexo de proteínas repressoras da transcrição de *RAGE*, aumentando o nível de expressão do gene *RAGE* em 3 vezes (Hudson et al., 2001).

Um dado importante foi o encontrado por Laki et al. (2007), que descreveram um forte desequilíbrio de ligação entre o alelo -429C da região promotora de *RAGE* e os alelos do haplótipo ancestral 8.1 (8.1 AH), o que inclui HLA-DRB1\*0301 e DQB1\*0201, TNF2 e mono-S-RCCX em uma população de húngaros com diabetes tipo 1. O haplótipo 8.1 AH têm sido associado ao desenvolvimento acelerado do HIV (Cameron et al., 1990), susceptibilidade ao diabetes tipo 1 (Hanifi et al., 1998), lúpus eritematoso sistêmico (Christiansen et al., 1991), dermatite herpiforme (Wilson et al., 1995) e miastenia grave (Degli-Esposti et al., 1992). É importante frisar que o haplótipo formado pelos alelos HLA-DRB1\*0301 e DQB1\*0201 foi associado a um aumento da resistência ao pêfingo foliáceo endêmico (Petzl-Erler e SantaMaria, 1989), apontando para uma possível associação do alelo -429C ao pêfingo foliáceo endêmico.

No polimorfismo G82S a substituição de guanina por adenina (G>A) na posição 555 (GGC→AGC) do exon 3 de *RAGE* gera alteração não-sinônima do resíduo de aminoácido no códon 82, com a substituição de glicina (G, Gly) por serina (S, Ser). O exon 3 codifica uma região de *RAGE* envolvida na interação com seus ligantes, portanto, alterações de resíduos de aminoácidos desta região da proteína são particularmente interessantes, já que podem alterar a interação de *RAGE* com seus ligantes (Hudson et al., 2002). Apesar do polimorfismo G82S ocorrer no provável sítio de interação com os ligantes, não é possível prever os efeitos estruturais deste polimorfismo já que a estrutura terciária da proteína *RAGE* ainda não é detalhadamente conhecida.

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

Não foi encontrada diferença na freqüência genotípica ou alélica do polimorfismo G82S entre indivíduos saudáveis e diabéticos tipo 2 com ou sem doença macrovascular numa população de asiáticos e caucasóides (Hudson et al.,



1998). Yoshioka et al. (2005) não encontraram relação entre o polimorfismo G82S e microalbuminúria (estágio inicial de nefropatia) em diabéticos tipo 2 em uma população japonesa. Por outro lado, Kanková et al. (1999) observaram uma maior frequência do genótipo SS em indivíduos diabéticos com *Psoriasis vulgaris*. Kumaramanickavel et al. (2002) também encontraram relação entre o polimorfismo G82S e retinopatia em diabéticos.

Seqüências intrônicas podem participar da ativação ou inibição de *splicing* (Venables, 2007), e estudos de polimorfismos em introns que possam estar associados a alterações do *splicing* do mRNA de *RAGE* ainda são escassos na literatura. Portanto, é interessante buscar um polimorfismo potencialmente relacionado ao *splicing* alternativo de *RAGE*.

Uma busca feita através do programa SNPBrowser™ v3.5.3 (Applied Biosystems), uma ferramenta computacional para seleção de SNPs candidatos a estudos de associação a doenças (disponível gratuitamente no endereço eletrônico [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)), revelou que o SNP 2741 G>A localizado no intron 9 próximo ao exon 10, numa região de interação com proteínas reguladoras do espliceossomo, poderia estar associado à geração da isoforma protetora sRAGE através de *splicing* alternativo. Esta isoforma solúvel de *RAGE* é resultado da conservação de parte do intron 9 que introduz um códon de parada na proteína, eliminando as regiões codificadas pelos exons 10 e 11, que codificam a hélice transmembrana e a cauda citosólica, transdutora de sinal (Schmidt et al., 1994; Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005). A Figura 4 mostra o polimorfismo 2741 G>A do intron 9 à montante do exon 10, bem como um esquema de seqüências intrônicas que interagem com as proteínas reguladoras do *splicing*.

As frequências alélicas do polimorfismo 2741 G>A reportadas no HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) são: 100,0% 2741G em europeus; 2,0% 2741A em asiáticos e em africanos.

a. Seqüência do gene *RAGE* evidenciando o alelo 2741G do intron 9 próximo ao exon 10

AGGAGGGGCCAACTGCAG**GTGAG**...GCTGTGCTCTCAATTTCCCTGTCTCC**G**TACAG**G**GCTCTGTGGGA

b. Esquema das seqüências de um intron que interagem com as proteínas reguladoras do *splicing*

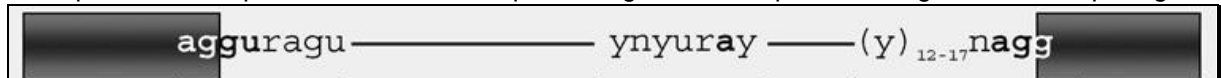


Figura 4. Localização do polimorfismo 2741G>A. a) Seqüência do gene *RAGE* evidenciando o alelo 2741G do intron 9 (em vermelho) a montante do exon 10. Os exons foram destacados em cinza e em branco, o intron; em negrito estão marcados os nucleotídeos da Regra GT-AG (nucleotídeos conservados nas extremidades de introns), e em branco estão os nucleotídeos vizinhos ao intron. Fonte: adaptado de Heidemann (comunicação oral). b) Seqüências conservadas que são relevantes para o *splicing*; as seqüências intrônicas são representadas por uma linha e, seqüências exônicas são caixas escuras. Fonte: adaptado de Blaustein et al. (2007).

### 3.3.3 Estrutura do Receptor RAGE

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

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

Duas outras formas do receptor RAGE resultantes de *splicing* alternativo são conhecidas. Além da forma completa de RAGE, uma proteína com 45 kDa, a isoforma C-truncada de RAGE tem 35 kDa e é secretada (Neeper et al., 1992). Esta isoforma é o chamado RAGE solúvel (sRAGE; item 3.3.2) que conserva parte do intron 9 (Schmidt et al., 1994; Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005). A proteína sRAGE é uma provável supressora da ativação e sinalização de RAGE, visto que seqüestra seus ligantes impedindo a transdução de sinal celular feita pela cauda

citossólica que está ausente, evitando dessa forma os efeitos da interação ligante-RAGE (Ding e Keller, 2005).

Segundo Yonekura et al. (2003) existe ainda uma forma N-truncada de RAGE, resultado da conservação do intron 1 que contém um códon de parada. Assim, o início de tradução deste mRNA passa a ser o segundo códon da metionina no exon 3, resultando na perda da seqüência de aminoácidos contida nos exons 1 e 2 além de parte do exon 3 (Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005). A forma N-truncada não contém o domínio imunoglobulina tipo V, o que também causa uma diminuição da capacidade de ligar os ligantes de RAGE (Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005).

Foram ainda identificadas formas de RAGE com 48 kDa e 23 kDa em células neuronais que provavelmente são resultado de processamento pós-traducional de RAGE (Brett et al., 1993).

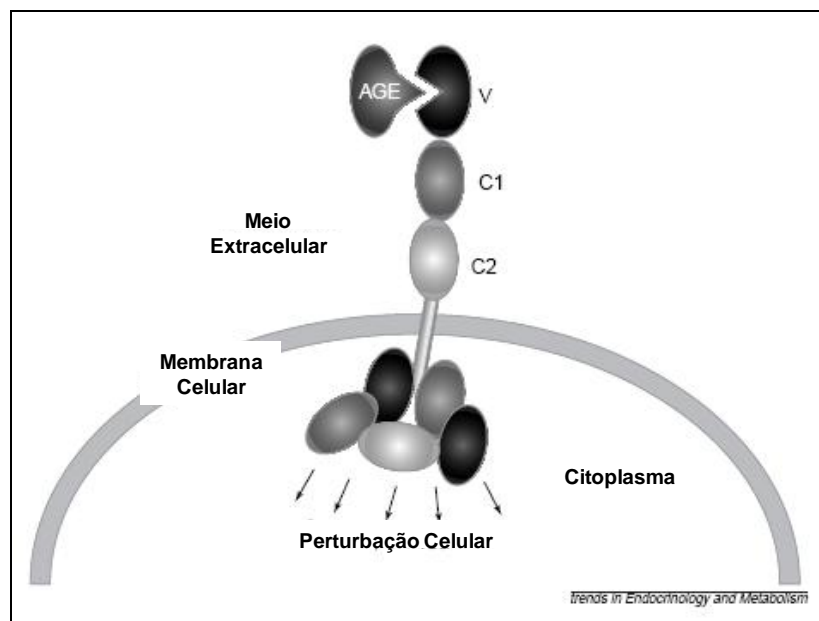


Figura 5. Representação esquemática da estrutura do receptor RAGE. Fonte: adaptado de Schmidt e Stern (2000).

O receptor RAGE é expresso em baixa concentração em vários tipos celulares, como células endoteliais vasculares, musculares lisas, glomerulares, macrófagos e monócitos (Brett et al., 1993). Em situações de acúmulo dos seus ligantes, bem como em estresse, desenvolvimento normal, diabetes, insuficiência renal, processos inflamatórios ou doença de Alzheimer (Yan et al., 1996; Nishikawa et al., 2000; Schmidt e Stern, 2000; Hudson et al., 2002), a expressão de *RAGE* é

extraordinariamente aumentada na retina, nas células glomerulares (epiteliais e mesangiais) e na aorta (Ritthaler et al., 1995; Soulis et al., 1997; Schmidt e Stern, 2000).

### 3.3.4 Ligantes de RAGE

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

Os ligantes da proteína RAGE mais conhecidos são os produtos finais de glicação avançada (AGEs ou *advanced glycation end products*), que constituem um grupo heterogêneo de compostos responsáveis por efeitos adversos, incluindo redução de atividade enzimática, danos a ácidos nucleicos, formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas, além de indução de vias citotóxicas (Brownlee, 1994). A formação de AGEs (Figura 6) ocorre pela natureza reativa de açúcares redutores, como a glucose que, por meio de seus grupos aldeídos ou cetonas, reagem não-enzimaticamente com grupos amino livres de proteínas, produzindo uma ligação irreversível. Esta reação foi descrita primeiramente por Luis-Camille Maillard em 1912 (Huttunen, 1996).

Um grande número de AGEs (Figura 7) têm sido isolado ou sintetizado *de novo*. Os mais estudados são a carboxi(metil)lisina (CML, N<sup>E</sup>-(carboximetil)lisina) (Ahmed et al., 1986) e a pentosidina (Sell et al., 1989). Os AGEs estão relacionados com diversas patologias, como por exemplo, doenças vasculares, complicações micro- e macro-vasculares do diabetes e arteriosclerose. O efeito mais conhecido dos AGEs é a sua capacidade de formar ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas gerando efeitos tóxicos no organismo.

A formação de AGEs causa alterações fisiopatológicas via três mecanismos (Brownlee, 1995): 1) a formação de AGEs na matriz extracelular prendendo

proteínas, e eventualmente, estreitando o lúmen de vasos sangüíneos; 2) a formação de AGEs intracelularmente, alterando estrutura e função de proteínas e; 3) AGEs interagem com receptores específicos, ativando vias pró-inflamatórias e pró-trombóticas através de estresse oxidativo e da ativação de fatores de transcrição, como é o caso da interação AGEs-RAGE.

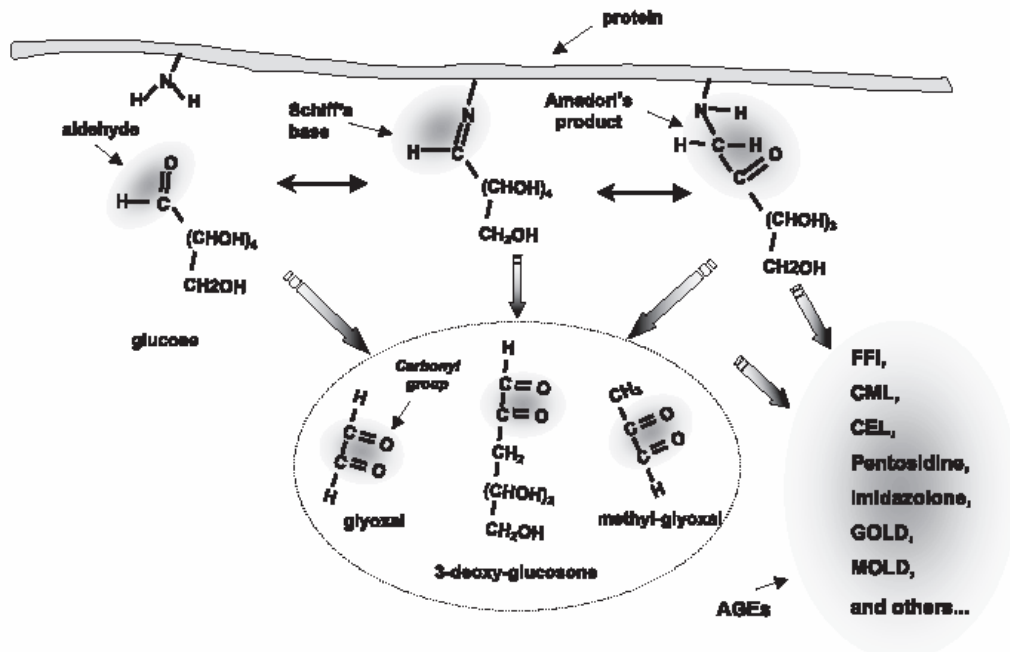


Figura 6. Modelo esquemático da formação de AGEs. Fonte: adaptado de Basta et al. (2004).

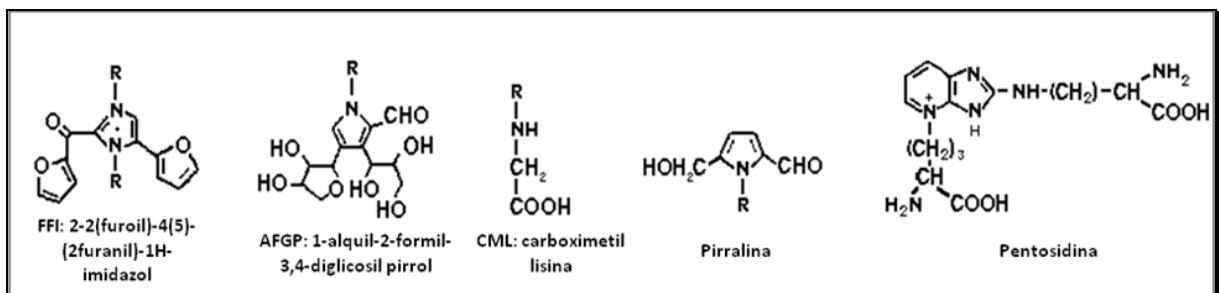


Figura 7. Estrutura química de AGEs. Fonte: adaptado de Huttunen (1996).

Além dos AGEs, outros ligantes de RAGE incluem os polipeptídeos S100/calgranulinas e as anfoterinas, com efeitos ainda pouco elucidados após a interação com RAGE. No entanto, sabe-se que ambas desempenham papel durante o desenvolvimento normal e em inflamação do tecido nervoso (Hudson et al., 2002). Além disso, os polipeptídeos S100/calgranulinas são citocinas da resposta pró-inflamatória e as anfoterinas participam da migração e invasão de tumores (Schmidt

et al., 2000). Selkoe (1994) mostrou que a proteína  $\beta$ -amilóide, formada através da proteólise da proteína amilóide, também é um dos ligantes de RAGE, sugerindo o envolvimento deste receptor na doença de Alzheimer. Neste mesmo estudo foi demonstrado que RAGE atua como mediador do transporte da proteína  $\beta$ -amilóide através da barreira sanguínea do cérebro contribuindo para o seu depósito na membrana basal de vasos sanguíneos.

### 3.4 EFEITOS DA ATIVIDADE DO RECEPTOR RAGE

RAGE é um mediador da transdução de sinal que desencadeia estresse oxidativo e ativação da expressão de fatores de transcrição, como por exemplo, o NF- $\kappa$ B (fator nuclear- $\kappa$ B), modulador da expressão de outros genes relacionados à resposta pró-inflamatória, ao estado de pró-coagulação e à vasoconstrição (Lapolla et al., 2005).

A ativação e translocação nuclear de NF- $\kappa$ B aumentam a expressão de proteínas envolvidas na adesão de leucócitos ao endotélio, um processo implicado com o início de lesões ateroscleróticas e de outros distúrbios vasculares (Collins, 1993; Chavakis et al., 2004). A proteína VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) é expressa no endotélio de placas ateroscleróticas, e gera aumento da adesão de monócitos (O'Brien et al., 1993), que são recrutados por quimiotaxia aos sítios de acúmulo de AGEs (Schmidt et al., 1993). A interação AGEs-RAGE causa ainda aumento da expressão de TF (fator tecidual) e de trombulina pelo endotélio (Westwood et al., 1995) e macrófagos (Ichikawa et al., 1998), iniciando um estado de pró-coagulação. O receptor RAGE ativado também induz a expressão de endotelina-1, um potente vasoconstritor que inibe a produção de prostaciclina e de óxido nítrico, contribuindo para a hipertensão em diabéticos. A inibição da produção de prostaciclina resulta em retinopatia por perda de perícitos (Yamagishi et al., 1995).

A ativação do receptor RAGE gera também o aumento nas concentrações de citocinas de resposta pró-inflamatória, como as interleucinas IL-1 $\alpha$  e IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) entre outros (Hofmann et al., 1999). O acúmulo de AGEs induz aumento da expressão de RAGE, portanto, receptor e ligante co-acumulam

nos glomérulos renais, retina e aorta de diabéticos como consequência de hiperglicemia (Soulis et al., 1997). A distribuição coincidente de receptor e ligante resulta em ativação prolongada do receptor, sugerindo uma alça de retroalimentação positiva (*feedback* positivo), onde a interação ligante-receptor aumenta a expressão do receptor (Schmidt et al., 2000).

O papel do receptor RAGE em condições fisiológicas normais permanece indefinido. Estudos recentes (Zhou et al., 2006) sugeriram um papel regulador de RAGE na maturação e função de osteoclastos. Após nocaute do gene *RAGE*, foi detectado um aumento da massa e da densidade de minerais no osso de camundongos, além de diminuição da atividade reabsortiva do osso *in vivo*. Experimentos *in vitro* sugerem que RAGE também está envolvido na reorganização, adesão e função da actina do citoesqueleto em osteoclastos (Zhou et al., 2006).

No entanto, em outro estudo foi observado que perda de percepção da dor foi prevenida em camundongos diabéticos com o gene *RAGE* nocauteado (Bierhaus et al., 2004). O mesmo estudo confirmou que alterações dependentes de RAGE incluem indução de migração celular e invasão de lesões ateroscleróticas por fagócitos mononucleares.

Estudos recentes têm mostrado uma associação entre a atividade de RAGE e resposta inflamatória em patologias intestinais. Tecido derivado de intestino inflamado apresentou um aumento significativo na expressão de *RAGE* e da ativação de NF- $\kappa$ B, sendo que esta ativação aumentada foi inibida por depleção de AGEs ou pela adição de sRAGE *in vitro* (Andrassy et al., 2006). Os resultados de Raman et al. (2006) sugerem que a ativação de RAGE é um fator chave na disfunção da mucosa intestinal após choque hemorrágico e ressuscitação, sendo que neste processo inicialmente ocorre uma hemorragia que é amenizada através de ressuscitação, ou seja, uma recuperação do estado de equilíbrio.

Gebhardt et al. (2008) mostraram que camundongos deficientes em *RAGE* são resistentes ao câncer de pele induzido por DMBA/TPA (um potente indutor de inflamação: 9,10-dimethylbenz[a]anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) além de exibirem problemas na manutenção da resposta inflamatória. Além disso, RAGE é necessário para o aumento de mediadores inflamatórios induzidos por TPA, manutenção da infiltração de células imunes e hiperplasia epidérmica. Estes resultados sugerem que a sinalização de RAGE leva à manutenção de uma resposta

inflamatória durante a promoção do tumor, além de fornecer evidência genética de um novo papel de RAGE, ligando inflamação crônica ao câncer (Gebhardt et al., 2008).

Até o momento existem poucas formas de reduzir a expressão de *RAGE*, dentre as quais se destaca o bloqueio da interação com seus ligantes através do uso de sRAGE ou de anticorpos. Além disso, o tratamento com aminoguanidina (um inibidor da formação de AGEs) reduz tanto os níveis de AGEs quanto a expressão de *RAGE* (Soulis et al., 1997).

A Figura 8 resume os principais efeitos da interação AGE-RAGE.

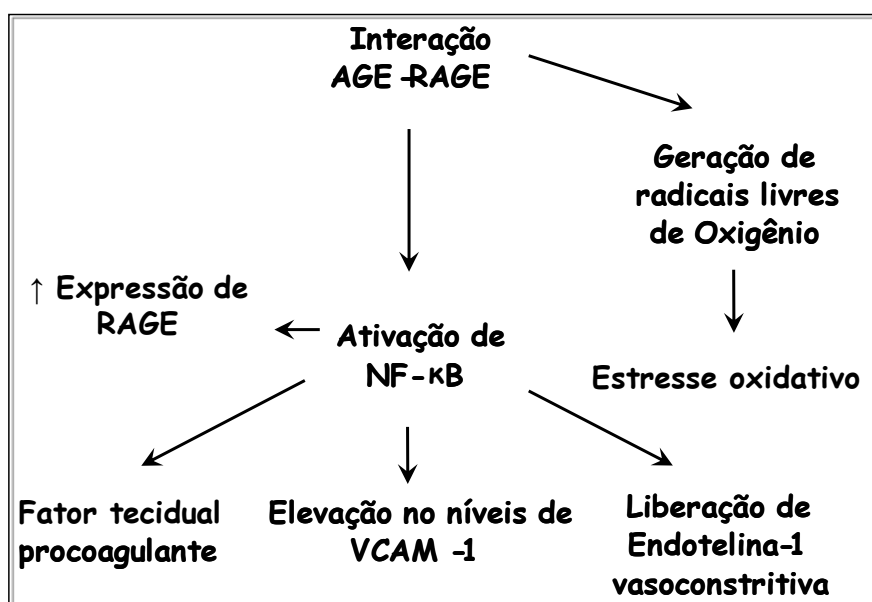


Figura 8. Principais efeitos da associação AGE-RAGE. Fonte: adaptado de Lapolla et al. (2005).

O gene *RAGE* foi escolhido como um candidato em potencial para a predisposição ao PFE por dois motivos. Em primeiro lugar, este receptor tem um papel relevante nos processos inflamatórios persistentes (Hudson et al., 2002), um fenômeno aparentemente presente no PFE. Em segundo lugar, alelos do gene *RAGE* estão em desequilíbrio de ligação com genes HLA, que possuem alelos associados ao PFE (Pavoni et al., 2003). Estudos de suas variantes alélicas e haplótipos contendo alelos HLA e de *RAGE* podem contribuir para a elucidação dos fatores responsáveis pela susceptibilidade ou proteção ao PFE e do desenvolvimento de novas terapias e medidas preventivas.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

A amostra populacional analisada neste trabalho foi coletada, caracterizada e catalogada pelo Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH) do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), coordenado pela Professora Dra. Maria Luiza Petzl-Erler.

A amostra populacional total contou com 763 indivíduos, da qual foram excluídos indivíduos consangüíneos, com pênfigo vulgar ou com etnia desconhecida. Dos 684 restantes foram ainda excluídos das análises 17 orientais (exclusivamente do grupo CTRL TOTAL) e 19 indígenas (16 do grupo PFE e 3 do grupo CTRL TOTAL), por constituírem número insuficiente de indivíduos para garantir comparações entre as etnias com poder estatístico. A amostra foi então dividida nos seguintes grupos: (1) pacientes portadores de pênfigo foliáceo endêmico (PFE) e (2) controle (CTRL TOTAL), ou seja, indivíduos sem a doença. Uma vez que a amostra populacional é etnicamente heterogênea e que subpopulações étnicas podem diferir quanto às frequências genóticas, alélicas e haplotípicas, os grupos foram subdivididos quanto à ancestralidade das amostras minimizando seus efeitos. Portanto, as análises estatísticas foram realizadas com 648 indivíduos no total, incluindo Euro-Brasileiros (EB) e Afro-Brasileiros (AB). Os resultados encontrados para indivíduos orientais e indígenas foram apenas citados para cada locus estudado.

O grupo EB é uma amostra populacional de origem predominantemente européia, na qual o componente de ancestralidade africana não é visível. A amostra populacional mestiça, de origem predominantemente africana e européia (o grupo AB) é composta de indivíduos mulatos claros (ancestralidade principalmente européia, mas com componente africano visível), mulatos médios (contribuição aproximadamente igual de ancestrais europeus e africanos), mulatos escuros e negros (ambos de ancestralidade predominantemente africana).

O fluxograma abaixo (Figura 9) esquematiza a divisão da amostra detalhada acima, bem como os critérios de exclusão e inclusão utilizados para selecionar a amostra final analisada.

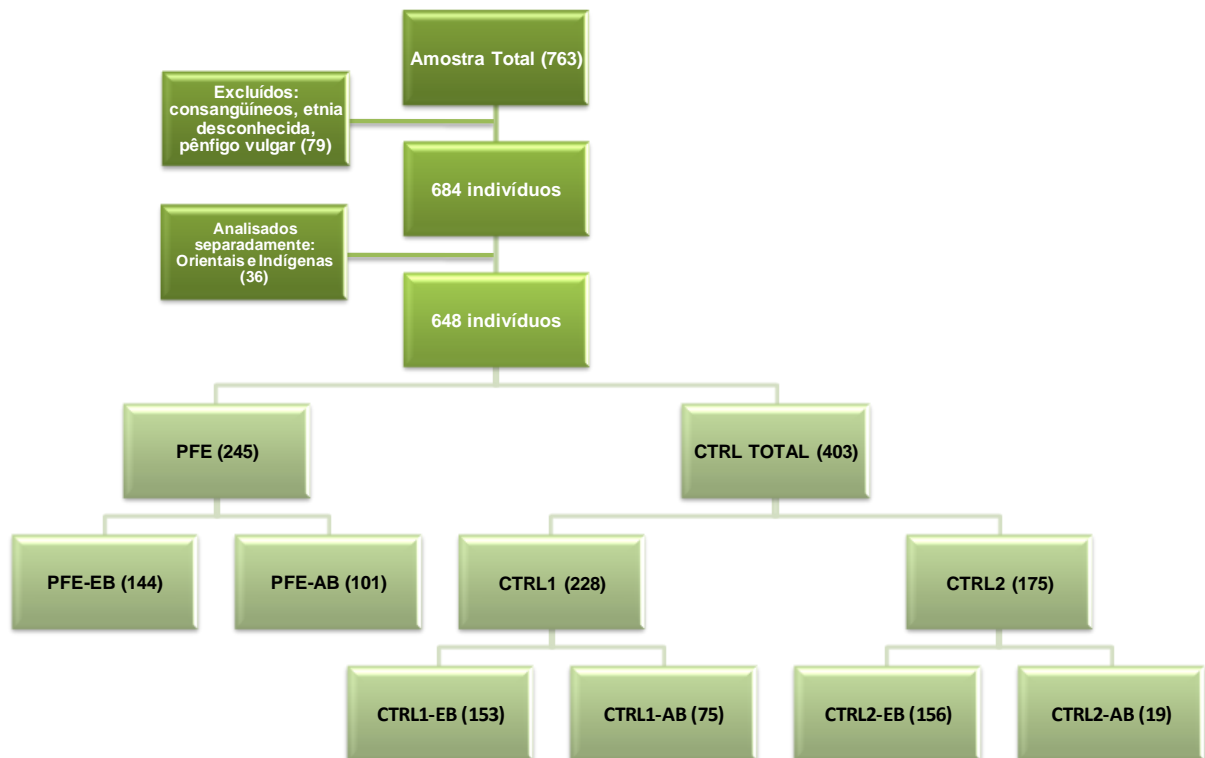


Figura 9. Fluxograma mostrando a divisão das amostras.

#### 4.1.1 Grupo de Portadores de Pênfigo Foliáceo Endêmico (PFE)

O grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico (PFE) totalizou 245 amostras, que foram coletadas no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara (Piraquara, PR) em 1988, e principalmente no Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, MS) em diferentes coletas entre 1997 e 2008. O diagnóstico destes pacientes foi realizado através de observações clínicas e exames imunopatológicos. Esta amostra foi subdividida quanto à ancestralidade (item 4.1) em 144 indivíduos pertencentes ao grupo PFE-EB e 101 ao grupo PFE-AB.

#### 4.1.2 Grupo Controle Total (CTRL TOTAL)

Devido à importância do fator ambiental no desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico o grupo controle deve estar pareado com o de pacientes no que diz respeito à origem geográfica e ocupação. Portanto, um grupo de indivíduos controle (CTRL TOTAL) constituído de 403 amostras obtidas principalmente no Mato

Grosso do Sul e no Paraná, foi subdividido em (1) controle de pênfigo (CTRL1) e (2) controle do Sul (CTRL2).

O subgrupo CTRL1 é constituído por amostras de 228 indivíduos coletadas no Hospital Adventista do Pênfigo ou em Postos de Saúde de Campo Grande (MS) entre 1997 e 2008. A composição deste subgrupo é similar àquela do grupo PFE em relação à origem geográfica, ambiente e condições de vida. Este subgrupo possui 153 indivíduos CTRL1-EB e 75 CTRL1-AB.

As 175 amostras restantes de indivíduos do grupo CTRL TOTAL foram obtidas no Hospital de Clínicas da UFPR, na Santa Casa de Misericórdia ou no Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em Curitiba entre 1988 e 2008. Este subgrupo foi denominado controle do Sul (CTRL2) e é constituído por 156 indivíduos CTRL2-EB e 19 CTRL2-AB.

Nas análises estatísticas o grupo CTRL TOTAL foi utilizado para aumentar o número da amostra quando as frequências alélicas, genotípicas, haplotípicas e de portadores do subgrupo CTRL1 eram estatisticamente similares àquelas do subgrupo CTRL2.

#### 4.1.3 Amostra pareada etnicamente

As análises também foram realizadas entre os grupos PFE e CTRL TOTAL pareados quanto à etnia originando os grupos PFEP e CTRL TOTALp para obtenção de maiores informações quanto às frequências genotípicas, alélicas, de portadores e haplotípicas, principalmente quando os grupos CTRL1 e CTRL2 se mostraram significativamente diferentes. Esse pareamento é realizado através do uso nos dois grupos de uma proporção igual de Euro-Brasileiros, bem como de negros, mulatos escuros, mulatos médios e mulatos claros (que estão incluídos em Afro-Brasileiros).

#### 4.1.4 Dados das amostras

As amostras de DNA analisadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo LGMH. O uso dessas amostras para investigar possíveis associações entre o PFE e genes candidatos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os voluntários foram

esclarecidos quanto ao objetivo e perspectivas da pesquisa e após o aceite preencheram o Termo de Consentimento de Participação no Estudo (Anexo I) e uma Ficha de Averiguação (Anexo II).

## 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de leucócitos de sangue periférico em amostras de sangue coletadas com EDTA dissódico pelo método de *salting-out* (Lahiri e Nurnberger, 1991) ou pelo método fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Sambrook et al., 1989). A concentração final do DNA genômico foi ajustada para  $\approx 20$  ng/ $\mu$ L. As amostras com DNA genômico extraído foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As etapas citadas neste item (4.2) foram realizadas por integrantes do laboratório LGMH.

## 4.3 GENOTIPAGEM

Os polimorfismos analisados foram nomeados considerando como nucleotídeo +1 a base A do códon ATG que corresponde à posição 6665 da seqüência do gene *RAGE* depositada no DDBJ/EMLB/Genbank sob o número de acesso D28769. Os polimorfismos estudados bem como os métodos utilizados para as genotipagens das amostras estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – POLIMORFISMOS ANALISADOS E RESPECTIVOS MÉTODOS

POLIMORFISMOS	dbSNP	METODOLOGIA
63 pb del (-407_-345del)	---	PCR
-429 T>C	rs1800625	PCR-RFLP
-374 T>A	rs1800624	PCR em Tempo Real
2741 G>A	rs2071288	PCR em Tempo Real

dbSNP: banco de dados de SNPs (*single nucleotide polymorphism database*); del: deleção; rs: referência do SNP (*reference SNP*).

Para obter a genotipagem de todas as amostras, foi necessário realizar uma precipitação com acetato de amônio 7,5 M (Anexo III) em 72 amostras que não amplificaram, retirando dessa forma possíveis inibidores da reação de PCR.

#### 4.3.1 Genotipagem do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*

A genotipagem do polimorfismo 63 pb del (-407\_-345del) da região promotora do gene *RAGE* foi realizada através de amplificação de parte desta região pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

O fragmento da região promotora do gene *RAGE* foi amplificado utilizando como oligonucleotídeos iniciadores os descritos por Hudson et al. (2001), que produzem um produto de PCR de 344 pb, correspondente à região entre os nucleotídeos -590 e -246:

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

O sistema de reação, bem como o programa utilizado, estão descritos nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Para a amplificação deste fragmento da região promotora foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf).

TABELA 2 – SISTEMA DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 344 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME (µL)
DNA molde (≈20 ng/µL)	≈1,0 ng/µL	1,0
Tampão Taq DNA polimerase (10x)	1x	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	1,5 mmol/L	1,2
dNTP (5 mmol/L)	0,2 mmol/L	0,8
Oligonucleotídeos Iniciadores (10 pmol/µL cada)	0,5 pmol/µL (cada)	1,0
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	0,05 U/µL	0,2
Água Reagente tipo 1 estéril	q.s.p. 20,0 µL	13,8
	Volume Final	20,0

Tampão Taq DNA polimerase (1x; Fermentas): 75 mmol Tris-HCl, 20 mmol (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,1% (v/v) Tween 20, pH 8,8 a 25°C. q.s.p.: quantidade suficiente para.

TABELA 3 - PROGRAMA PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 344 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

NÚMERO DE CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1x	Desnaturação	94	2 min
35x	Desnaturação	94	40 s
	Anelamento	60	40 s
	Extensão	72	45 s
1x	Extensão Final	72	10 min

Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese submarina em gel de agarose 1,5% (cuba Horizon 58, Life Technologies) em voltagem constante de 60 Volts,  $\approx$ 22 mA, em temperatura ambiente durante cerca de uma hora, em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2  $\mu$ L da solução de produto de PCR, misturada a 3  $\mu$ L de solução de aplicação (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens obtidas com uma câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP) foram armazenadas em computador e também impressas.

A Figura 10 mostra o perfil eletroforético típico de produtos de PCR de parte da região promotora do gene *RAGE*, contendo os genótipos: (1) II, sem a deleção; (2) ID, deleção em heterozigose e; (3) DD, deleção em homozigose.

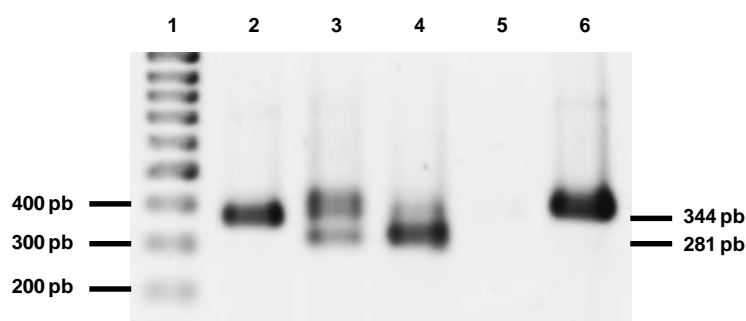


Figura 10. Perfil eletroforético do produto de PCR da região promotora (344 pb) de *RAGE*. Evidenciando o polimorfismo 63 pb del em gel de agarose 1,5% (tampão TBE 1x) corado com brometo de etídeo. Linhas 1: marcador de massa molecular de 100 pb; Linhas 2, 3 e 4: genótipos II (sem a deleção), ID (deleção em heterozigose) e DD (deleção em homozigose), respectivamente; Linha 5 e 6: controles negativo e positivo, respectivamente. À esquerda do gel estão os tamanhos do marcador de massa e à direita estão os tamanhos dos fragmentos obtidos.

#### 4.3.2 Genotipagem do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*

A genotipagem do polimorfismo -429 T>C foi realizada através da reação de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms* ou reação em cadeia da polimerase - polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição) como descrito por Picheth (2007). Os produtos de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* foram obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.1) e submetidos à clivagem com a enzima de restrição AluI (New England's BioLabs) nas condições descritas na (Tabela 4) produzindo um padrão de restrição característico para cada genótipo. A Figura 11 mostra o mapa de restrição e o perfil eletroforético esperado.

TABELA 4 – SISTEMA DE REAÇÃO DA RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DE 344 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE* COM A ENZIMA AluI

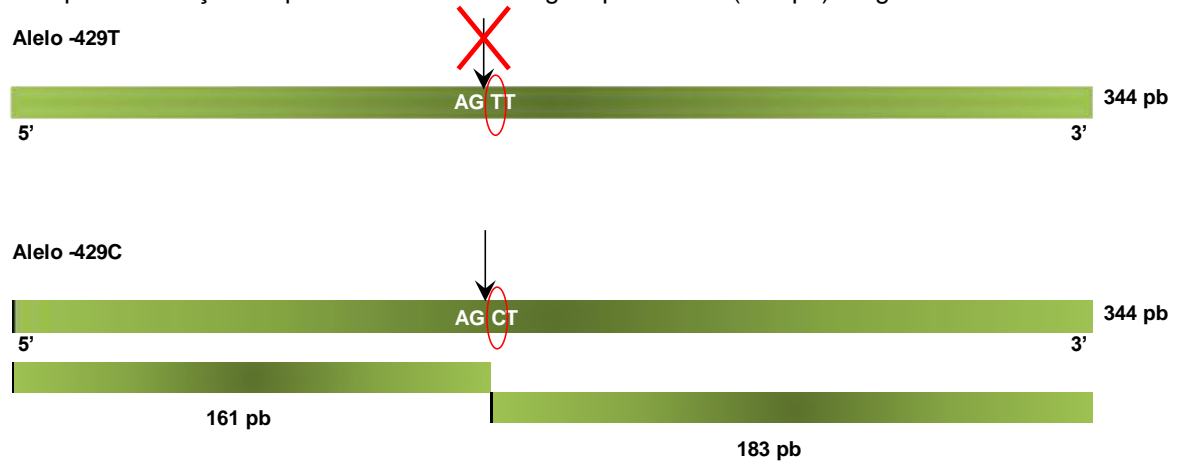
REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME ( $\mu\text{L}$ )
Produto de PCR	$\approx 1,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$	2,0
Tampão NEBuffer 2 (10x)	1x	1,0
AluI (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0,15 U/ $\mu\text{L}$	0,15
Água Reagente Tipo 1 estéril	q.s.p. 10,0 $\mu\text{L}$	6,85
Volume Final		10,0

Homogeneizar e incubar a 37°C por 16 horas

Tampão NEBuffer 2 (1x; New England Biolabs): 50 mmol NaCl; 10 mmol Tris-HCl; 10 mmol  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mmol DTT, pH 7,9 a 25°C. q.s.p.: quantidade suficiente para.

O produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* (Figura 11b) que apresenta o genótipo usual TT na posição -429 não possui o sítio de restrição de AluI, portanto, apresenta apenas uma banda de 344 pb após a restrição do produto de amplificação. A transição de timina para citosina na posição -429 da região promotora (AG↓CT) leva ao aparecimento de um sítio de restrição para AluI, gerando os fragmentos de 183 pb e 161 pb para o homocigoto CC. Finalmente, o genótipo do heterocigoto TC apresenta os fragmentos de 344 pb, 183 pb e 161 pb.

a. Mapa de restrição do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE*



b. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*

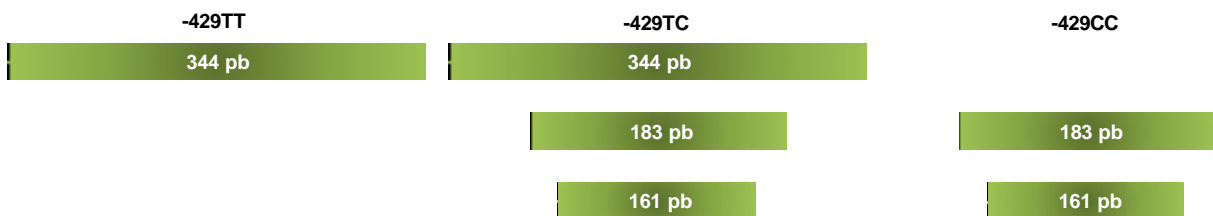


Figura 11. Clivagem do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* com a enzima de restrição AluI. a) Mapa de restrição do produto de PCR, as setas indicam os sítios de restrição para a enzima AluI. Em destaque a ausência do sítio de restrição (X) na região do alelo selvagem -429T. b) Representação esquemática do perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*.

Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (proporção de acrilamida:bisacrilamida de 20:1 ou 29:1) em tampão TBE 1x (item 4.3.1) a  $\approx 8^{\circ}\text{C}$  (Sistema Mini Protean<sup>®</sup> 3 Cell, Bio-Rad). As eletroforeses foram realizadas com 5  $\mu\text{L}$  ( $\approx 12$  ng) do produto de restrição misturado a 5  $\mu\text{L}$  de solução de aplicação (item 4.3.1), em voltagem constante de 100 V,  $\approx 15$  mA, por cerca de duas horas. Após a corrida eletroforética o DNA foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens obtidas com uma câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP) foram armazenadas em computador e também impressas. A Figura 12 mostra o perfil eletroforético típico deste ensaio para a genotipagem do polimorfismo -429 T>C.

Algumas amostras apresentaram um perfil eletroforético anômalo e diferente daqueles mostrados na Figura 12. Estes produtos de PCR da região promotora do gene *RAGE* foram então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1) para identificação de polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP ou *Single Strand Conformation Polymorphism*) (item 4.4.1). Finalmente, para determinar



com precisão a causa dessa migração eletroforética anômala o produtos de PCR foi seqüenciado diretamente (item 4.4.4) ou clonado e posteriormente seqüenciado (itens 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4, respectivamente).

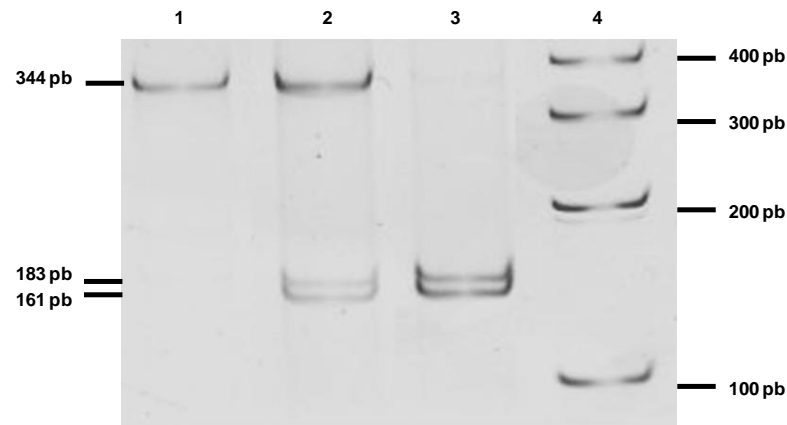


Figura 12. Perfil eletroforético do polimorfismo -429 T>C. Evidenciando os produtos de PCR da região promotora do gene *RAGE* após clivagem com a enzima *AluI* em gel de poliacrilamida 8% (29:1) (tampão TBE 1x) corado com brometo de etídeo. Linhas 1, 2 e 3: perfil eletroforético dos genótipos TT, TC e CC, respectivamente. Linha 4: marcador de massa molecular de 100 pb. À esquerda do gel estão os tamanhos dos fragmentos obtidos e à direita, estão os tamanhos do marcador de massa.

#### 4.3.3 Genotipagem dos polimorfismos -374 T>A da região promotora e 2741 G>A do intron 9 do gene *RAGE*

Os polimorfismos do gene *RAGE*, -374 T>A da região promotora e 2741 G>A do intron 9, foram genotipados através da reação em cadeia da polimerase com aquisição de dados em tempo real (Real Time PCR, PCR em Tempo Real ou RT-PCR). Para isto foi utilizado o sistema TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems) em um termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) instalado no Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da UFPR. O programa 7500 System SDS (Sequence Detection Software) versão 1.2.3 (Applied Biosystems) foi utilizado nas análises e caracterização dos genótipos.

A genotipagem por PCR em Tempo Real foi realizada utilizando o reagente TaqMan<sup>®</sup> Genotyping Assay Mix (Assay ID C\_\_3293837\_1\_ para o -374 T>A; Assay ID C\_\_15861169\_10 para o 2741 G>A; Applied Biosystems) específico para cada região e que contém um par de oligonucleotídeos iniciadores e um par de sondas fluorescentes alelo-específicas (Applied Biosystems). Também foi utilizado o reagente TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) contendo

AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP (Ultra Pura), dNTPs, Referência Passiva 1 (ROX), tampão e aditivos otimizados para a reação de PCR em Tempo Real. A reação foi conduzida conforme as especificações do fabricante (Applied Biosystems). As Tabelas 5 e 6 descrevem a composição do sistema de reação e o programa utilizado, respectivamente.

TABELA 5 – SISTEMA DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME (µL)
DNA molde diluído em água (≈20 ng)	≈3,3 ng/µL	1,0
SNP Genotyping Assay Mix (20x)	1x	0,3
TaqMan® Genotyping Master Mix (2x)	1x	3,0
Água Reagente tipo 1 estéril	q.s.p. 6,0 µL	1,7
	Volume Final	6,0

q.s.p.: quantidade suficiente para.

TABELA 6 - PROGRAMA PARA GENOTIPAGEM POR PCR EM TEMPO REAL DOS SNPS -374 T>A E 2741 G>A

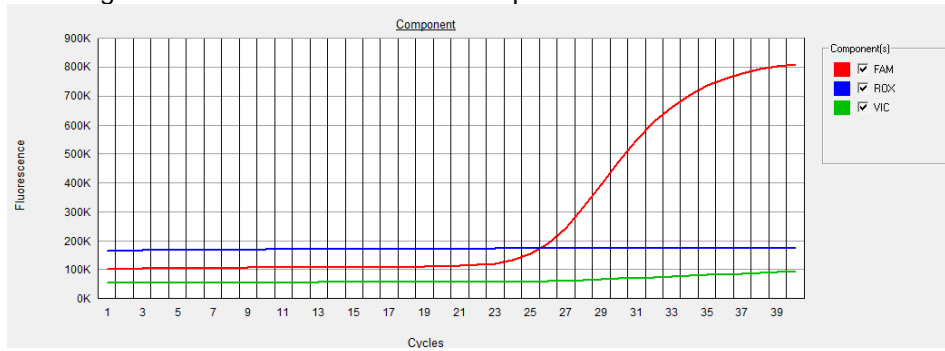
NÚMERO DE CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1x	Desnaturação	95	10 min
40x	Desnaturação	95	15 s
	Anelamento e Extensão*	60	1 min

\*Ao fim da etapa de anelamento e extensão ocorre a detecção da fluorescência.

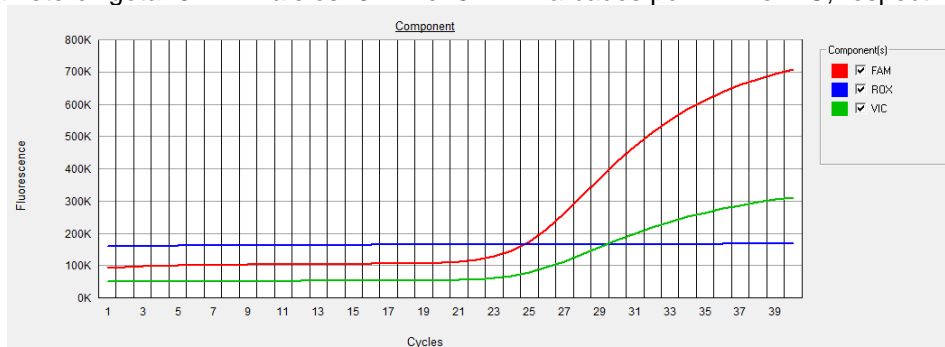
A Figura 13 exemplifica um tipo de gráfico resultante do programa 7500 System SDS (Sequence Detection Software) Version 1.2.3 (Applied Biosystems) acoplado ao termociclador ABI7500 após genotipagem do SNP -374 T>A. Para a análise do SNP 2741 G>A foram obtidos gráficos similares.

A detecção da fluorescência das sondas alelo-específicas digerida pela AmpliTaq Gold® DNA Polymerase permite a determinação da presença ou ausência dos alelos. É importante lembrar que em cada placa de PCR em Tempo Real foram colocados controles positivos de cada um dos três genótipos dos SNPs para determinar se a reação estava funcionando, bem como um controle negativo para garantir que não havia contaminação na reação.

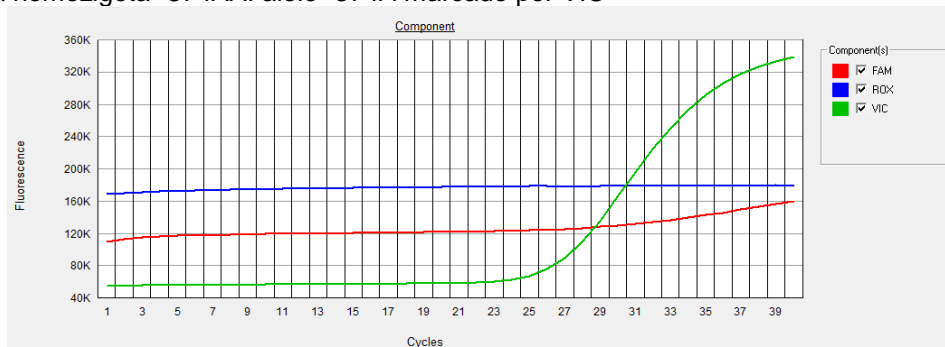
a. Amostra homozigota -374TT: alelo -374T marcado por FAM



b. Amostra heterozigota -374TA: alelos -374T e -374A marcados por FAM e VIC, respectivamente



c. Amostra homozigota -374AA: alelo -374A marcado por VIC



d. Controle negativo da reação de PCR EM TEMPO REAL

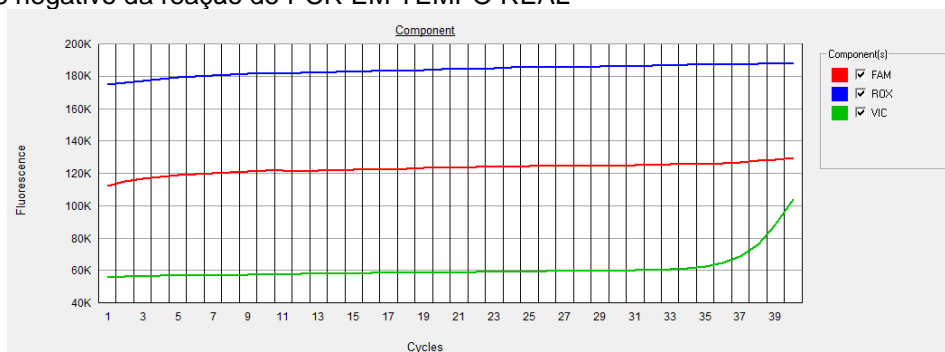


Figura 13. Representação gráfica dos resultados da genotipagem do polimorfismo -374 T>A obtidos através de PCR em Tempo Real utilizando o sistema TaqMan<sup>®</sup>. a) Amostra homozigota para o alelo -374T que corresponde à sonda marcada por FAM (linha vermelha indica aumento de fluorescência de FAM); b) Amostra heterozigota contendo os alelos -374T e -374A marcados por FAM e VIC, respectivamente (linhas vermelha e verde indicam aumento da fluorescência de FAM e VIC, respectivamente); c) Amostra homozigota para o alelo -374A que corresponde à sonda marcada por FAM (linha verde indica aumento fluorescência de VIC); d) Controle negativo da reação de PCR em Tempo Real. A linha azul representa a variação da fluorescência do fluoróforo ROX.

Nos gráficos da Figura 13 é possível observar a variação da intensidade da fluorescência dos fluoróforos VIC e FAM, que marcam as sondas alelo-específicas, e ROX, referência passiva, que permite normalizar a intensidade da fluorescência em razão de variações no volume e na concentração das amostras.

No entanto, apenas os resultados da PCR em Tempo Real do polimorfismo -374 T>A são insuficientes para a genotipagem desta região, pois o ensaio TaqMan<sup>®</sup> detecta apenas duas formas alélicas, mas o locus -374 é tri-alélico, uma vez que o polimorfismo 63 pb del causa a perda dessa posição. Portanto, para a análise de frequência de polimorfismos desta posição, foi necessário considerar os indivíduos com o polimorfismo 63 pb del, que foi genotipado por PCR e eletroforese em gel de agarose 2,0 % (item 4.3.1). Assim se o polimorfismo 63 pb del estiver presente em heterozigose, o indivíduo apresentará só um alelo T ou A na posição -374, e o outro será o alelo D (do polimorfismo 63 pb del). Quando o polimorfismo 63 pb del aparecer em homozigose, o indivíduo possuirá dois alelos D e não apresentará a região -374.

Finalmente, a genotipagem do SNP -374 T>A da região promotora de *RAGE* foi confirmada através da clivagem do produto de PCR de 344 pb com a enzima de restrição Tsp509I em uma reação de PCR-RFLP (Anexo IV). A genotipagem do SNP 2741 G>A do intron 9 foi confirmada pelo seqüenciamento (item 4.4.4) do produto de PCR após clonagem no vetor pCR<sup>®</sup>2.1 (itens 4.4.2 e 4.4.3).

#### 4.4 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES E CONFIRMAÇÃO DA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO 2741 G>A

##### 4.4.1 Polimorfismo de conformação de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* ou SSCP) do produto de PCR da região promotora do gene *RAGE*

A análise de polimorfismos de conformação de fita simples (SSCP) foi realizada para identificação de mutações potencialmente novas, nas amostras estudadas. Estas potenciais novas mutações foram previamente identificadas por

que apresentaram um perfil eletroforético diferente em gel de poliacrilamida 8% (20:1 ou 29:1) após a reação de PCR-RFLP (itens 4.3.1 e 4.3.2).

Ao produto de PCR (4  $\mu$ L) foi adicionado 10  $\mu$ L de formamida (950  $\mu$ L de formamida, EDTA 1mmol/L, azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%); a mistura foi incubada a 98 °C por 10 minutos, e em seguida resfriada em gelo. Esta foi aplicada em gel de poliacrilamida 8% (29:1) contendo glicerol 1% e TBE 0,5x. A eletroforese foi conduzida em voltagem constante de 100 V,  $\approx$ 15 mA, por cerca de doze horas (cuba Gibco, Life Technologies). Após a corrida eletroforética o DNA foi corado em brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens capturadas Sistema Biochemi, UVP foram armazenadas em computador e também impressas.

#### 4.4.2 Clonagem de produtos de PCR

Para seqüenciamento de novas regiões polimórficas de indivíduos heterozigotos, o produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* (344 pb) foi primeiramente clonado no vetor pCR2.1 e em seguida o inserto de plasmídeos recombinantes foi seqüenciado (item 4.4.4). Essas etapas também foram realizadas para confirmação da genotipagem do polimorfismo 2741 G>A do intron 9 do gene *RAGE* através do ensaio de PCR em Tempo Real, sistema TaqMan<sup>®</sup> (item 4.3.3).

Para clonagem dos produtos de PCR foi utilizada a capacidade da Taq DNA polimerase de introduzir um resíduo A na extremidade 3' do fragmento independente de DNA molde. Esta atividade leva a produção de produtos de PCR contendo extremidades 3' com uma ponta A coesiva. Este fragmento pode ser ligado ao vetor pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen) linearizado com pontas coesivas 3'-T. O sistema de ligação utilizado está resumido na Tabela 7.

O plasmídeo pCR<sup>®</sup>2.1 apresenta também as seguintes características relevantes: gene *lacZ $\alpha$* ; sítio para os oligonucleotídeos M13 universal e reverso; sítio de múltipla clonagem; origem de replicação f1 e pUC; e gene de resistência à ampicilina e canamicina.

TABELA 7 – SISTEMA DA REAÇÃO DE LIGAÇÃO.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME (µL)
Produto de PCR	≈1,2 ng/µL	3,0
pCR®2.1 (5 ng/µL)	1,0 ng/µL	2,0
Tampão Ligation Buffer (10x)	1x	1,0
T4 DNA ligase (10 U/µL)	0,1 U/µL	1,0
Água Reagente Tipo 1 estéril	q.s.p. 10,0 µL	3,0
Volume Final		10,0
Homogeneizar e incubar a 10°C por cerca de 12 horas		

Tampão de Ligação (1x; Fermentas): 40 mmol Tris-HCl, 10 mmol MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol DTT, 0,5 mmol ATP, pH 7,8 a 25°C. q.s.p.: quantidade suficiente para.

*Escherichia coli* estirpe DH10B (Sambrook et al., 1989) resistente à estreptomicina, F' [*proAB*, *lacZΔM15*], foi utilizada como hospedeiro dos plasmídeos recombinantes. Para introdução de plasmídeos por eletrotransformação, uma colônia de *E. coli* estirpe DH10B foi inoculada em 2 mL de meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L) contendo estreptomicina (20 µg/mL). Este pré-inóculo foi então incubado a 37°C por 12 horas sob agitação constante (120 rpm). Após esse período, 1 mL do pré-inóculo foi re-inoculado em 50 mL de meio SOB (triptona 20g/L; extrato de levedura 5g/L; cloreto de potássio 0,186 g/L; cloreto de sódio 0,5 g/L) e a cultura foi incubada a 37°C sob agitação constante até atingir D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 a 0,8.

A cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos e as células foram coletadas por centrifugação a 4°C por 5 minutos (4.500 xg) e lavadas duas vezes com água ultrapura estéril a ≈8°C. As células eletrocompetentes foram ressuspensas em ≈200 µL de água e alíquotas de 30 µL foram colocadas em cubetas de eletroporação. A cada alíquota de suspensão de células eletrocompetentes foram adicionados 0,5 µL de plasmídeo recombinante; então as amostras foram submetidas a uma rápida corrente elétrica (4KΩ, 330 µF).

Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio SOC (meio SOB acrescido de cloreto de magnésio 0,94 g/L; sulfato de magnésio 1,2 g/L; glucose 3,6 g/L) às células que foram incubadas por 30 minutos em estufa a 37°C. Finalmente, a suspensão foi plaqueada em meio LA (meio LB acrescido de ágar 15g/L) contendo canamicina (50 µg/mL) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosídeo; 30 µg/mL) e incubadas a 37°C até o aparecimento de colônias azuis e brancas.

#### 4.4.3 Mini-preparação de plasmídeo

Para purificar os plasmídeos recombinantes pelo menos 3 colônias brancas isoladas de cada genótipo foram inoculadas separadamente em 3 mL de meio LB contendo canamicina (50 µg/mL) a 37°C sob agitação constante (120 rpm) por cerca de 12 horas. Alíquotas de 1,5 mL desta cultura foram centrifugadas (12.000 xg) por 1 minuto. Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso em 200 µL de solução GET a ≈8°C (glucose 50 mmol/L; EDTA 10 mmol/L; Tris-HCl 25 mmol/L; pH 8,0). Foram então adicionados 200 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L; SDS 1%) e a amostra foi homogeneizada gentilmente por inversão até a observação da lise.

O lisado foi neutralizado pela adição de 200 µL de Kacf (3,0 mol/L de acetato de potássio; 1,8 mol/L de ácido fórmico), sendo a mistura homogeneizada gentilmente e incubada em gelo por 15 minutos. Após centrifugação por 15 minutos (12.000 xg), o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 2 µL de RNase (10 mg/mL) seguido de incubação a 37°C por cerca de duas horas. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram adicionados ao sobrenadante e após a homogeneização, a amostra foi centrifugada por 5 minutos (12.000 xg) e a fase aquosa foi transferida para um tubo novo. A esta fase aquosa foi adicionado 0,6 volume de isopropanol e após homogeneização, a solução foi centrifugada por 20 minutos (12.000 xg). Depois de descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos (12.000 xg). Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco e ressuspenso em 25 µL de água reagentes tipo 1 estéril.

Para confirmar se as colônias brancas escolhidas de fato possuíam o produto de PCR, os plasmídeos isolados foram clivados com a enzima de restrição EcoRI (Tabela 8).

TABELA 8 – SISTEMA DE REAÇÃO DA RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM A ENZIMA EcoRI

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME (μL)
DNA plasmidial	≈5,0 ng/μL	1,5
Tampão REact® 3 (10x)	1x	2,0
EcoRI (10 U/μL)	0,15 U/μL	0,3
Água Reagente Tipo 1 estéril	q.s.p. 20,0 μL	16,2
Volume Final		20,0

Homogeneizar e incubar a 37°C por 2 horas

Tampão REact® 3 (1x; Invitrogen): 50 mmol Tris-HCl; 10 mmol Tris-HCl; 10 mmol MgCl<sub>2</sub>; 100 mmol NaCl, pH 8,0 a 37 °C. q.s.p.: quantidade suficiente para.

Uma alíquota de 10 μL da solução dos produtos de restrição misturada a 5 μL de solução de aplicação (item 4.3.1) foi aplicada em gel de agarose 2% (cuba Horizon 58, Life Technologies) e submetida a eletroforese submarina em voltagem constante de 70 V, ≈40 mA, à temperatura ambiente durante cerca de duas horas, em tampão TBE 1x (item 4.3.1). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 μg/mL) e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens (Figura 14) foram obtidas com uma câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP) e armazenadas em computador além de impressas.

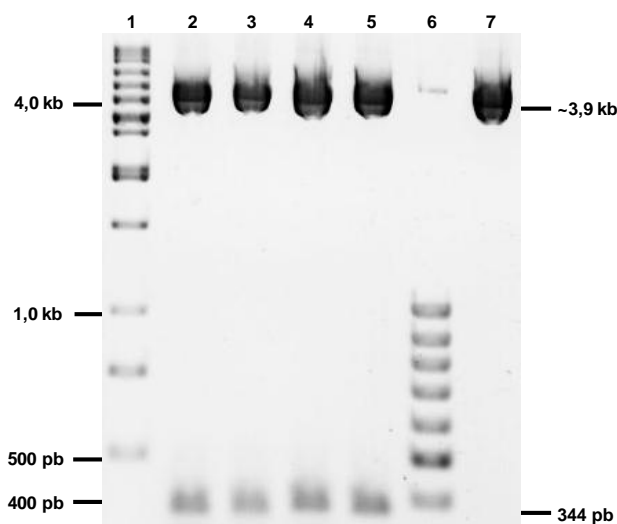


Figura 14. Perfil eletroforético de plasmídeos recombinantes após restrição com EcoRI. Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1x. Linha 1: marcador de massa molecular de 1 kb; Linhas 2, 3, 4 e 5: perfil eletroforético de plasmídeo recombinante após clivagem com a enzima EcoRI, evidenciando o produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE*; Linha 6: marcador de massa molecular de 100 pb; Linha 7: perfil eletroforético de plasmídeo não-recombinante. À esquerda do gel estão os tamanhos do marcador de massa e à direita do gel está indicado o tamanho esperado dos fragmentos após a reação de restrição.



#### 4.4.4 Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento dos insertos, os plasmídeos foram purificados como descrito no item 4.4.3. Os componentes da reação de seqüenciamento e o programa do termociclador para a reação estão resumidos nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

TABELA 9 – SISTEMA DE REAÇÃO DO SEQÜENCIAMENTO

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME ( $\mu\text{L}$ )
DNA plasmidial	>20,0 ng/ $\mu\text{L}$ para plasmídeos; >2,7 ng/ $\mu\text{L}$ para fragmento de PCR	3,0
Oligonucleotídeos Iniciadores (F ou R) (10pmol/ $\mu\text{L}$ cada)	0,5 pmol/ $\mu\text{L}$	0,4
ET Terminator Mix (GE Healthcare)	1x	3,0
Água Reagente Tipo 1 estéril	q.s.p. 7,5 $\mu\text{L}$	1,1
	Volume Final	7,5

q.s.p.: quantidade suficiente para.

TABELA 10 - PROGRAMA DA REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

NÚMERO DE CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA ( $^{\circ}\text{C}$ )	TEMPO
1x	Desnaturação	94	2 min
35x	Desnaturação	94	30 s
	Anelamento	60	1 min 30 s

A reação de seqüenciamento também foi realizada utilizando o próprio produto de PCR como molde quando os indivíduos eram homozigotos para os polimorfismos de interesse. Para isso foi necessária a remoção dos oligonucleotídeos iniciadores e dos desoxiribonucleotídeos livres da reação de PCR inicial. Neste caso antes da reação de seqüenciamento 4  $\mu\text{L}$  do produto de PCR ( $\approx 12\text{ng}$ ) foram tratados com Exol (3,3 U) e fosfatase alcalina de camarão (ou SAP 6,6 U); a mistura foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos e a  $80^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos.

Os produtos da reação de seqüenciamento foram precipitados adicionando 2  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e depois centrifugada por 30 minutos (12.000 xg). Depois de descartado o sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 10 minutos (12.000 xg); o sobrenadante foi

novamente descartado e o precipitado foi seco sob vácuo. Depois deste tratamento o DNA foi dissolvido em formamida (1-2  $\mu$ L) e submetido à eletroforese em seqüenciador automático de DNA ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

A montagem das seqüências contíguas a partir das seqüências direta (F) e reversa (R) obtidas de uma mesma amostra, e a detecção de mutações, foram realizadas através do programa CodonCode Aligner 2.0.6 para Windows (versão para demonstração; <http://www.codoncode.com/>). Este programa foi alimentado com arquivo em extensão “.scf” gerado pelo programa Phred/Phrap (Ewing et al, 1998; <http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e CONSED (Gordon et al, 1998).

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O programa Statistica 5.5 (StatSoft, Inc.) para Windows foi utilizado para as determinações de média, desvio padrão e freqüências dos sexos.

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se os dois subgrupos étnicos separadamente, EB e AB, dentro dos grupos de PFE e CTRL TOTAL. Os subgrupos CTRL1 e CTRL2 foram comparados entre si e, quando as freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas eram estatisticamente similares, os subgrupos eram unidos formando o grupo CTRL TOTAL para aumentar o número da amostra e assim tornar as análises estatísticas mais confiáveis. Ainda, quando os subgrupos CTRL1 e CTRL2 eram estatisticamente diferentes, apenas o subgrupo CTRL1 foi utilizado; em outra comparação as amostras de indivíduos controle (CTRL TOTAL<sub>p</sub>) e com pênfigo (PFE<sub>p</sub>) foram pareadas de acordo a etnia para homogeneizar a ancestralidade e evitar associações espúrias ao pênfigo foliáceo endêmico (item 4.1.3).

Os genótipos obtidos de todos os indivíduos foram armazenados em um banco de dados, em formato Access (Microsoft Office 2007). As freqüências genotípicas e de portadores para cada variante foram então obtidas por contagem direta pelo programa CONVERT 1.1. (Probst, 1998), que também gera o arquivo de entrada de dados para o pacote de programas ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2006), que calcula as freqüências alélicas. As freqüências de alelos, genótipos e

haplótipos foram comparadas entre os grupos utilizando o algoritmo metropolis implementado no programa RXC (Miller, 1997).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado através do método de Guo e Thompson (1992) implementado no pacote de programas ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2006).

O pacote de programas ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2006) também foi usado para estimar as frequências haplotípicas pelo método de máxima verossimilhança, empregando o algoritmo EM (maximização da expectativa), e para calcular o coeficiente de desequilíbrio de ligação ( $D'$ ) e o coeficiente de correlação ( $r^2$ ).

Para as comparações entre os grupos com diferenças estatisticamente significativas dos dados genéticos, foi estimada uma razão de probabilidade (*odds ratio* ou OR) (Woolf, 1955) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). O valor da OR para doenças raras reflete o risco relativo (RR), ou seja, a chance que os portadores de determinado fator têm de desenvolver a patologia, em relação aos indivíduos que não possuem o fator. O valor de  $OR=1,0$  indica que os indivíduos com ou sem o fator, têm a mesma probabilidade de desenvolver a patologia. Valores acima de 1,0 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença e valores abaixo de 1,0, indicam uma menor probabilidade.

Para todas as análises estatísticas foi considerado significativo um valor de probabilidade menor que 5% ( $P<0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Todos os participantes deste estudo responderam um questionário, através do qual foram obtidas informações relevantes para o pareamento dos indivíduos quanto ao grupo étnico, bem como informações sobre o ambiente e condições de vida. Deste questionário foram retirados os dados necessários para a análise discutida a seguir.

A Figura 15 mostra as regiões nas quais ocorreu o aparecimento da lesão primária característica nos portadores de pênfigo foliáceo endêmico (PFE), sendo que na grande maioria dos casos estudados (75,9%) a manifestação primária ocorreu na região Centro-Oeste.

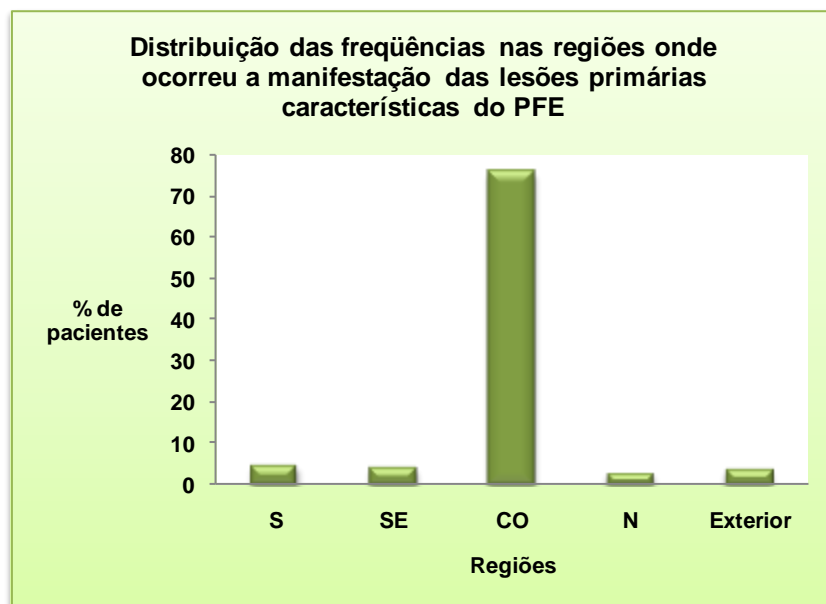


Figura 15. Distribuição das freqüências nas regiões do território brasileiro onde ocorreu início de manifestação das lesões características do pênfigo foliáceo endêmico. S: Sul; SE: Sudeste; CO: Centro-Oeste; N: Norte; Exterior: outros países.

Como descrito anteriormente (item 4.1.2), a grande maioria do grupo CTRL1 (78,8%) foi formada por indivíduos com residência na região Centro-Oeste, e em menor proporção, também no Sul (17,7%), Sudeste (1,7%) e Norte (1,3%). Por outro lado, o grupo CTRL2 foi formado principalmente por indivíduos residentes da região

Sul (93,7%) bem como por indivíduos das regiões Sudeste (0,5%), Centro-Oeste (0,5%), e de fora do país (0,5%).

A faixa etária na qual apareceram as primeiras lesões características do pênfigo foliáceo endêmico nos portadores de pênfigo foliáceo (PFE) indica uma predominância do aparecimento da doença de 10 a 50 anos (74,3%), sendo que a idade média de aparecimento das primeiras lesões foi de  $32,9 \pm 16,3$  anos (Figura 16). A idade média na data da coleta das amostras foi de  $43,0 \pm 17,3$  anos no grupo PFE,  $46,6 \pm 15,5$  no subgrupo CTRL1 e  $33,8 \pm 13,2$  no subgrupo CTRL2.

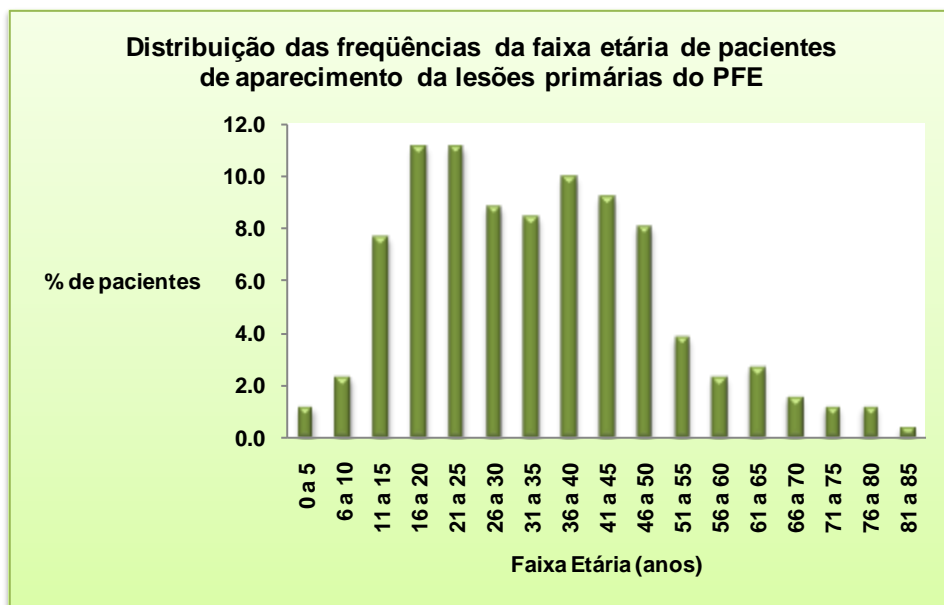


Figura 16. Distribuição das freqüências da faixa etária de pacientes na qual houve o aparecimento da lesão característica do pênfigo foliáceo endêmico.

Os resultados obtidos apontam para uma agregação familiar do pênfigo foliáceo endêmico na amostra estudada visto que 80,8% dos pacientes analisados possuíam familiares afetados pela doença, enquanto apenas 8,8% informaram que não possuíam familiares afetados.

A proporção mulheres:homens é de cerca de 1:1 entre os grupos PFE (55,6% mulheres e 44,4% homens) e CTRL TOTAL (54,8% mulheres e 44,9% homens) nesta amostra. A distribuição de indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino (Figura 17) também foi próxima de 1:1 em PFE (55,6% mulheres e 44,4%) e CTRL1 (52,4% homens e 47,6% mulheres). No entanto, foi observada uma proporção próxima de 2:1 no subgrupo CTRL2 (63,5% mulheres e 36,5% homens).

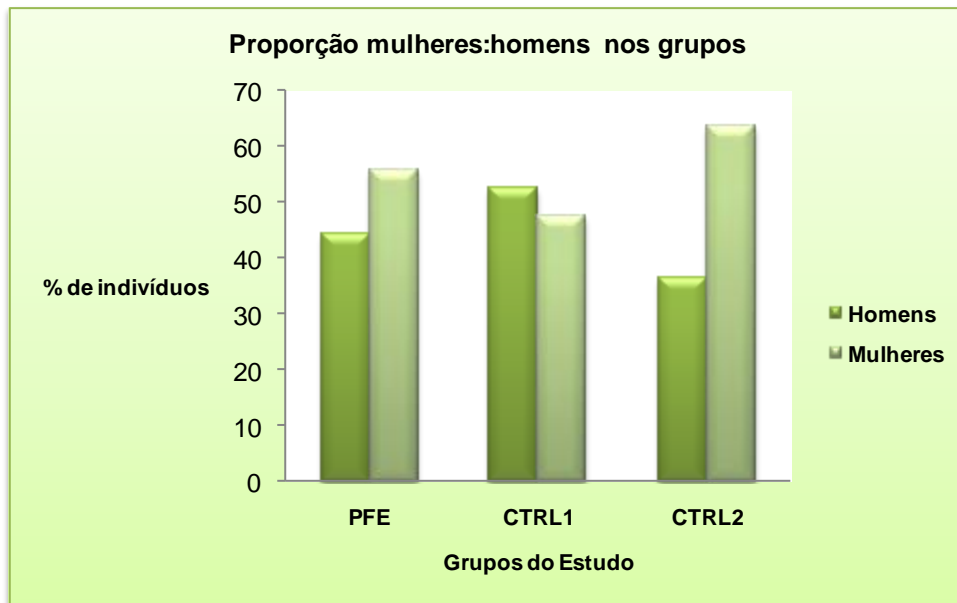


Figura 17. Proporção mulheres:homens nos grupos. PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul.

A distribuição quanto à ocupação é mostrada na Figura 18. Uma predominância de trabalhadores rurais foi observada no grupo PFE (60,5%) e no subgrupo CTRL1 (68,8%), em menor proporção encontraram-se ainda do lar (PFE: 16,1%; CTRL1: 4,8%), estudantes (PFE: 1,9%; CTRL1: 1,7%) e outros (PFE: 11,1%; CTRL1: 24,7%). O subgrupo CTRL2, entretanto, apresentou a maioria dos indivíduos atuando em áreas diversas classificadas como outros (72,4%), além de estudantes (22,4%), porém estiveram ausentes neste grupo trabalhadores rurais e do lar.

O grau de instrução (Figura 19) dos indivíduos analisados se distribuiu de forma similar em PFE e CTRL1, sendo que a maioria destes são indivíduos com ensino fundamental incompleto (PFE: 49,4%; CTRL1: 54,1%). Por outro lado, a maioria dos indivíduos do subgrupo CTRL2 (45,3%) tinha ensino superior completo.

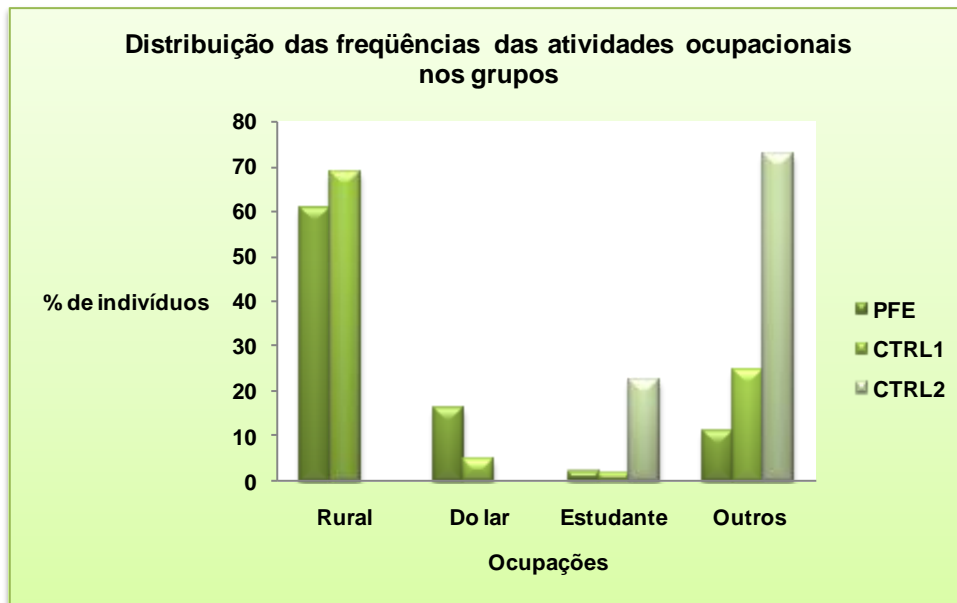


Figura 18. Distribuição das freqüências das atividades ocupacionais nos grupos. PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul.

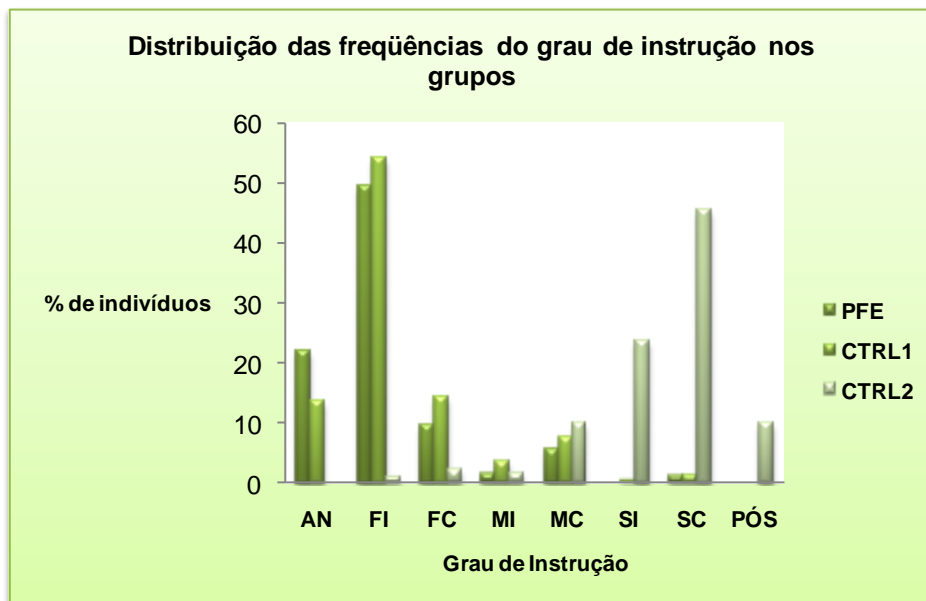


Figura 19. Distribuição das freqüências do grau de instrução nos grupos. PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul. AN: analfabetos; FI, MI, SI: ensinos fundamental, médio e superior incompletos, respectivamente; FC, MC, SC: ensinos fundamental, médio e superior completos, respectivamente; Pós: pós-graduação.

## 5.2 GENOTIPAGEM

### 5.2.1 Análise de associação individual do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*

O polimorfismo 63 pb del foi genotipado através de amplificação de um fragmento da região promotora do gene *RAGE* (344 pb) pelo ensaio de PCR (item 4.3.1). As freqüências obtidas para esta posição em todas as subpopulações se mostraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 11, 12 e 13).

A análise estatística do polimorfismo 63 pb del revelou uma diferença significativa entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB nas freqüências genóticas ( $P=0,024$ ) e alélicas ( $P=0,016$ ), que também se refletiu na freqüência de portadores ( $P=0,04$ ) (Tabela 11). Esses resultados mostram que os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB são diferentes para o polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*.

TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		CTRL1 (153)	CTRL2 (156)		CTRL1 (75)	CTRL2 (19)	
Genótipos % (n)	II	93,5 (143)	98,7 (154)	<b>0,02*</b>	90,7 (68)	94,7 (18)	1,00
	ID	5,9 (9)	1,3 (2)		9,3 (7)	5,3 (1)	
	DD	0,6 (1)	0,0		0,0	0,0	
Alelos (%)	D	4,0	1,0	<b>0,02*</b>	5,0	3,0	1,00
Portadores % (n)	I	99,3 (152)	100 (156)	<b>0,04*</b>	100 (75)	100 (19)	1,00
	D	6,5 (10)	1,3 (2)		9,3 (7)	5,3 (1)	
	HW (P)	0,17	1,00		1,00	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pêfnigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; II, ID e DD: genótipos do polimorfismo 63 pb del, homocigoto sem a deleção, heterocigoto e homocigoto com a deleção, respectivamente; I e D: alelos do polimorfismo 63 pb del, inserção e deleção, respectivamente. \*Diferenças significativas marcadas em negrito.

Portanto, para garantir o pareamento relativo ao ambiente e à ancestralidade (itens 4.1.2 e 4.5), as comparações foram realizadas entre PFE-EB e CTRL1-EB (Tabela 12). Não foi encontrada diferença significativa ( $P>0,05$ ) nas comparações entre PFE-EB e CTRL1-EB, e entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB (CTRL1-AB



somado à CTRL2-AB), tanto nas freqüências genótípicas e alélicas, quanto na de portadores (Tabela 12).

TABELA 12 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		PFE (144)	CTRL1 (153)		PFE (101)	CTRL TOTAL (94)	
Genótipos % (n)	II	94,4 (136)	93,5 (143)	0,26	84,2 (85)	91,5 (86)	0,12
	ID	4,9 (7)	5,9 (9)		15,8 (16)	8,5 (8)	
	DD	0,7 (1)	0,6 (1)		0,0	0,0	
Alelos (%)	D	3,1	4,0	0,75	7,9	4,0	0,13
Portadores % (n)	I	99,3 (143)	99,3 (152)	0,82	100,0 (101)	100,0 (94)	0,19
	D	5,6 (8)	6,5 (10)		15,8 (16)	8,5 (8)	
HW (P)		0,12	0,17		1,00	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL TOTAL: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; II, ID e DD: genótipos do polimorfismo 63 pb del, homocigoto sem a deleção, heterocigoto e deleção em homocigose, respectivamente; I e D: alelos do polimorfismo 63 pb del, inserção e deleção, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas.

Dos 17 orientais do subgrupo CTRL2, 16 possuíam o genótipo II (homocigoto sem a deleção), e apenas um, ID (heterocigoto); e nos indígenas (3 PFE e 16 CTRL1) esse locus se mostrou monomórfico, com indivíduos portando apenas o genótipo II.

Além da diferença significativa das freqüências alélicas, genótípicas e de portadores entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 11), também foi detectada uma diferença entre PFE-EB e PFE-AB (genótipos:  $P=0,01$ ; alelos:  $P=0,02$ ; portadores:  $P=0,03$ ). Essas diferenças sugerem a necessidade de uma comparação usando as amostras pareadas etnicamente, ou seja, entre PFEp e CTRL TOTALp (item 4.1.3), minimizando o fator ancestralidade como uma possível diferença entre os grupos (Tabela 13). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos PFEp e CTRL TOTALp para o polimorfismo 63 pb del.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE PFEp E CTRL TOTALp DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

Amostra Pareada Etnicamente				
		PFEp (236)	CTRL TOTALp (236)	P
Genótipos % (n)	II	91,5 (216)	93,2 (220)	0,80
	ID	8,1 (19)	6,4 (15)	
	DD	0,4 (1)	0,4 (1)	
Alelos (%)	D	4,0	4,0	1,00
Portadores % (n)	I	99,6 (235)	99,6 (235)	0,60
	D	8,5 (20)	6,8 (16)	
HW (P)		0,37	0,26	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFEp: indivíduos do grupo de pacientes de pênfigo foliáceo endêmico pareados etnicamente com o CTRL TOTALp; CTRL TOTALp: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2 pareados etnicamente com PFEp; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; II, ID e DD: genótipos do polimorfismo 63 pb del, homocigoto sem a deleção, heterocigoto e homocigoto com a deleção, respectivamente; I e D: alelos do polimorfismo 63 pb del, inserção e deleção, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas.

### 5.2.2 Análise de associação individual do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*

O polimorfismo -429 T>C foi genotipado através de PCR-RFLP (item 4.3.2). As frequências obtidas para este locus em todas as subpopulações se distribuíram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 14 e 15).

O tratamento estatístico dos dados obtidos para o SNP -429 T>C revelou que os grupos CTRL1 e CTRL2 são similares tanto em Euro- quanto em Afro-Brasileiros (Tabela 14). Logo, foi possível realizar as comparações entre PFE e CTRL TOTAL em ambos os subgrupos étnicos.

TABELA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		CTRL1 (153)	CTRL2 (156)		CTRL1 (75)	CTRL2 (19)	
Genótipos % (n)	TT	83,0 (127)	78,9 (123)	0,29	81,3 (61)	89,5 (17)	0,82
	TC	15,0 (23)	20,5 (32)		16,0 (12)	10,5 (2)	
	CC	2,0 (3)	0,6 (1)		2,7 (2)	0,0	
Alelos (%)	C	10,0	11,0	0,79	11,0	5,0	0,55
Portadores % (n)	T	98,0 (150)	99,4 (155)	0,49	97,3 (73)	100 (19)	0,73
	C	17,0 (26)	21,1 (33)		18,7 (14)	10,5 (2)	
HW (P)		0,13	1,00		0,18	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TC e CC: genótipos do polimorfismo -429 T>C; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C. Não foram encontradas diferenças significativas.

Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os grupos PFE e CTRL TOTAL (Tabela 15), tanto de frequências genótípicas quanto de portadores nos dois subgrupos étnicos. Porém, as frequências alélicas diferiram entre PFE-EB e CTRL TOTAL-EB (CTRL1-EB somado ao CTRL2-EB). O risco relativo ( $OR \approx RR$ ) calculado para esta fraca associação foi de 0,61 [0,34 – 1,07].

TABELA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL TOTAL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		PFE (144)	CTRL TOTAL (309)		PFE (101)	CTRL TOTAL (94)	
Genótipos % (n)	TT	87,5 (126)	80,9 (250)	0,15	85,1 (86)	83,0 (78)	0,88
	TC	12,5 (18)	17,8 (55)		12,9 (13)	14,9 (14)	
	CC	0,0	1,3 (4)		2,0 (2)	2,1 (2)	
Alelos (%)	C	6,0	10,0	<b>0,04*</b>	8,4	9,6	0,69
Portadores % (n)	T	100,0 (144)	98,7 (305)	0,14	98,0 (99)	97,9 (92)	0,85
	C	12,5 (18)	19,1 (59)		14,9 (15)	17,0 (16)	
HW (P)		1,00	0,53		0,13	0,19	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL TOTAL: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TC e CC: genótipos do polimorfismo -429 T>C; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C. \*A diferença significativa está destacada em negrito.

Não foram encontradas diferenças significativas das frequências entre os grupos pareados etnicamente (item 4.1.3; Tabela 16). No grupo de orientais (CTRL2) foram encontrados 13 indivíduos com o genótipo TT e 4 com o genótipo

TC. Entre os indígenas, os 3 indivíduos do subgrupo CTRL1 e 13 do grupo PFE apresentaram o genótipo TT, e os outros 3 indivíduos PFE apresentaram o genótipo TC.

TABELA 16 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE<sub>p</sub> E CTRL TOTAL<sub>p</sub> DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -429 T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Amostra Pareada Etnicamente		P
		PFE <sub>p</sub> (236)	CTRL TOTAL <sub>p</sub> (236)	
Genótipos, % (n)	TT	86,9 (205)	83,1 (196)	0,37
	TC	12,3 (29)	14,8 (35)	
	CC	0,8 (2)	2,1 (5)	
Alelos (%)	C	7,0	10,0	0,14
Portadores (n)	T	99,1 (234)	97,9 (231)	0,32
	C	13,1 (31)	16,9 (40)	
HW (P)		0,31	0,05	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFE<sub>p</sub>: indivíduos do grupo de pacientes de pênfigo foliáceo endêmico pareados etnicamente com o CTRL TOTAL<sub>p</sub>; CTRL TOTAL<sub>p</sub>: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2 pareados etnicamente com PFE<sub>p</sub>; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TC e CC: genótipos do polimorfismo -429 T>C; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C. Não foram encontradas diferenças significativas.

### 5.2.3 Análise de associação individual do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*

O polimorfismo -374 T>A foi genotipado através de PCR em Tempo Real, sistema TaqMan<sup>®</sup> (item 4.3.3). O polimorfismo 63 pb del engloba a região do SNP -374 T>A (item 4.3.3), o que faz com que essa posição esteja ausente quando a deleção está presente em homozigose ou ainda, presente de forma haplóide quando a deleção está em heterozigose. Por isso, a posição -374 da região promotora do gene *RAGE* foi considerada como um polimorfismo com três alelos: T, A e D (alelo da deleção). As frequências obtidas para esta posição em todas as subpopulações também se mostraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 17, 18 e 19).

Os resultados obtidos para o polimorfismo -374 T>A revelaram uma diferença significativa próxima do limiar entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB das frequências alélicas (P=0,04), sendo que a frequência de portadores (P=0,05) se mostrou no limiar de significância entre os mesmos grupos (Tabela 17). Esses resultados mostram que os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB são estatisticamente

diferentes para o SNP -374 T>A. No entanto, é importante notar que essa diferença desapareceu quando os indivíduos com o polimorfismo 63 pb del foram excluídos da análise, neste caso os valores de P obtidos nas comparações entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB para as freqüências genotípicas, alélicas e de portadores foram de 0,24, 0,41 e 0,54, respectivamente; entre CTRL1-AB e CTRL2-AB, o P das freqüências obtidas foi de 1,00 para freqüências de genótipos, alelos e de portadores.

TABELA 17 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		CTRL1 (153)	CTRL2 (156)		CTRL1 (75)	CTRL2 (19)	
Genótipos % (n)	TT	50,3 (77)	45,5 (71)	0,08	53,4 (40)	57,9 (11)	0,53
	TA	33,3 (51)	44,9 (70)		33,3 (25)	31,5 (6)	
	AA	9,8 (15)	8,3 (13)		4,0 (3)	5,3 (1)	
	TD	4,6 (7)	1,3 (2)		8,0 (6)	0,0	
	AD	1,3 (2)	0,0		1,3 (1)	5,3 (1)	
	DD	0,7 (1)	0,0		0,0	0,0	
	Alelos (%)	A	27,0		31,0	<b>0,04*</b>	
	D	4,0	1,0	5,0	3,0		
Portadores % (n)	T	88,2 (135)	91,7 (143)	0,05**	94,7 (71)	89,5 (17)	0,93
	A	44,4 (68)	53,2 (83)		38,7 (29)	42,1 (8)	
	D	6,5 (10)	1,3 (2)		9,3 (7)	5,3 (1)	
	HW (P)	0,11	0,67		1,00	0,27	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TA e AA: genótipos do polimorfismo -374 T>A; T e A: alelos do polimorfismo -374 T>A. \*As diferenças significativas estão marcadas em negrito. \*\*Valor no limiar da significância.

Com tudo isso, as comparações foram realizadas entre PFE-EB e CTRL1-EB, garantindo a homogeneidade do ambiente e da ancestralidade. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre PFE-EB e CTRL1-EB, bem como entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB (CTRL1-AB somado a CTRL2-AB), tanto de freqüências genotípicas e alélicas, quanto de portadores (Tabela 18). No grupo de orientais (CTRL2), 13 indivíduos possuíam o genótipo TT, 3 indivíduos o TA, e apenas 1 apresentou o genótipo TD. No grupo de indígenas, 4 indivíduos eram TT (2 PFE e 2 CTRL1), 9 TA (8 PFE e 1 CTRL1) e 6 AA (PFE).

TABELA 18 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

	Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
	PFE (144)	CTRL1 (153)		PFE (101)	CTRL TOTAL (94)	
Genótipos % (n)	TT	41,7 (60)	50,3 (77)	43,6 (44)	54,3 (51)	0,26
	TA	45,8 (66)	33,3 (51)	32,7 (33)	33,0 (31)	
	AA	6,9 (10)	9,8 (15)	7,9 (8)	4,2 (4)	
	TD	2,8 (4)	4,6 (7)	14,8 (15)	6,4 (6)	
	AD	2,1 (3)	1,3 (2)	1,0 (1)	2,1 (2)	
	DD	0,7 (1)	0,7 (1)	0,0	0,0	
Alelos (%)	A	31,0	27,0	25,0	22,0	0,54
	D	3,0	4,0	8,0	4,0	
Portadores % (n)	T	90,3 (130)	88,2 (135)	91,1 (92)	93,6 (88)	0,58
	A	54,9 (79)	44,4 (68)	41,6 (42)	39,4 (37)	
	D	5,6 (8)	6,5 (10)	15,8 (16)	8,5 (8)	
HW (P)		0,07	0,11	0,19	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL TOTAL: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TA, AA, TD, AD, DD: genótipos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del; T, A e D: alelos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del. Não foram encontradas diferenças significativas.

Assim como observado para o polimorfismo 63 pb del, foi detectada uma diferença significativa das frequências alélicas entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 17). Também foi detectada uma diferença entre os subgrupos PFE-EB e PFE-AB (genótipos: P=0,01; alelos: P=0,03; portadores: P=0,01). Novamente, é importante enfatizar que essa diferença não foi detectada quando os indivíduos com o polimorfismo 63 pb del foram excluídos da análise (genótipos: P=0,39; alelos: P=0,50; portadores: P=0,61). Essas diferenças apontam para uma necessidade de comparação usando as amostras pareadas etnicamente (item 4.1.3), minimizando o fator ancestralidade como uma possível diferença entre os grupos (Tabela 18). Essa análise mostrou que os grupos PFEp e CTRL TOTALp são estatisticamente similares para o polimorfismo -374 T>A + 63 pb del.

TABELA 19 - COMPARAÇÃO ENTRE PFEp E CTRL TOTALp DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO -374 T>A + 63 PB DEL DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

Amostra Pareada Etnicamente				
		PFEp (236)	CTRL TOTALp (236)	P
Genótipos % (n)	TT	42,8 (101)	52,1 (123)	0,40
	TA	41,1 (97)	33,1 (78)	
	AA	7,6 (18)	8,1 (19)	
	TD	6,4 (15)	5,1 (12)	
	AD	1,7 (4)	1,3 (3)	
	DD	0,4 (1)	0,4 (1)	
Alelos (%)	A	29,0	25,0	0,38
	D	4,0	4,0	
Portadores % (n)	T	90,3 (213)	90,3 (213)	0,53
	A	50,4 (119)	42,4 (100)	
	D	8,5 (20)	6,8 (16)	
HW (P)		0,41	0,21	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFEp: indivíduos do grupo de pacientes de pênfigo foliáceo endêmico pareados etnicamente com o CTRL TOTALp; CTRL TOTALp: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2 pareados etnicamente com PFEp; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; TT, TA, AA, TD, AD, DD: genótipos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del; T, A e D: alelos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del. Não foram encontradas diferenças significativas.

#### 5.2.4 Análise de associação individual do polimorfismo 2741 G>A do intron 9 do gene *RAGE*

O polimorfismo 2741 G>A foi genotipado através de PCR em Tempo Real, sistema TaqMan<sup>®</sup> (item 4.3.3). Assim como para as outras posições, as frequências obtidas para este locus em todas as subpopulações se mostraram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabelas 20, 21 e 22).

A análise do SNP 2741 G>A revelou uma diferença significativa entre as frequências genóticas, alélicas, e de portadores, entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 20). Esses resultados indicam que os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB são diferentes entre si, conseqüentemente, como para os polimorfismos 63 pb del e -374 T>A (itens 5.2.1 e 5.2.3), as análises de associação foram realizadas entre PFE-EB e CTRL1-EB. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre PFE-EB e CTRL1-EB e entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB, tanto de frequências genóticas e alélicas, quanto de portadores (Tabela 21).

TABELA 20 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DO INTRON 9 DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		CTRL1 (153)	CTRL2 (156)		CTRL1 (75)	CTRL2 (19)	
Genótipos % (n)	GG	93,5 (143)	98,7 (154)	<b>0,02*</b>	90,7 (68)	94,7 (18)	1,00
	GA	5,9 (9)	1,3 (2)		9,3 (7)	5,3 (1)	
	AA	0,6 (1)	0,0		0,0	0,0	
Alelos (%)	A	4,0	1,0	<b>0,02*</b>	5,0	3,0	1,00
Portadores % (n)	G	99,3 (152)	100 (156)	<b>0,04*</b>	100 (75)	100 (19)	1,00
	A	6,5 (10)	1,3 (2)		9,3 (7)	5,3 (1)	
	HW (P)	0,17	1,00		1,00	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; GG, GA e AA: genótipos do polimorfismo 2741 G>A; G e A: alelos do polimorfismo 2741 G>A. \*As diferenças significativas estão marcadas em negrito.

TABELA 21 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *RAGE*

		Euro-Brasileiros (EB)		P	Afro-Brasileiros (AB)		P
		PFE (144)	CTRL1 (153)		PFE (101)	CTRL TOTAL (94)	
Genótipos % (n)	GG	95,1 (137)	93,5 (143)	0,80	83,2 (84)	91,5 (86)	0,08
	GA	4,2 (6)	5,9 (9)		16,8 (17)	8,5 (8)	
	AA	0,7 (1)	0,6 (1)		0,0	0,0	
Alelos (%)	A	3,0	4,0	0,57	7,9	4,0	0,09
Portadores % (n)	G	99,3 (143)	99,3 (152)	0,63	100,0 (101)	100,0 (94)	0,14
	A	4,9 (7)	6,5 (10)		16,8 (17)	8,5 (8)	
	HW (P)	0,09	0,17		1,00	1,00	

n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFE: indivíduos do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL TOTAL: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; GG, GA e AA: genótipos do polimorfismo 2741 G>A; G e A: alelos do polimorfismo 2741 G>A. Não foram encontradas diferenças significativas.

Dos 17 orientais do subgrupo CTRL2, foram encontrados 16 portando o genótipo GG, e apenas um (1), GA; e o grupo de indígenas (3 PFE e 16 CTRL1) se mostrou monomórfico para este locus, assim como o polimorfismo 63 pb del, com indivíduos portando o genótipo GG.

Além da diferença estatística das frequências genóticas, alélicas e de portadores entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 20), foi detectada uma diferença entre os grupos PFE-EB e PFE-AB (genótipos: P=0,003; alelos: P=0,03; portadores: P=0,01). Neste caso, portanto, também foi realizada a comparação entre os grupos pareados etnicamente, PFEp e CTRL TOTALp (item



4.1.3). Essa análise confirmou que esta posição não está associada ao pênfigo foliáceo endêmico, visto que os grupos PFEp e CTRL TOTALp são estatisticamente similares entre si (Tabela 22).

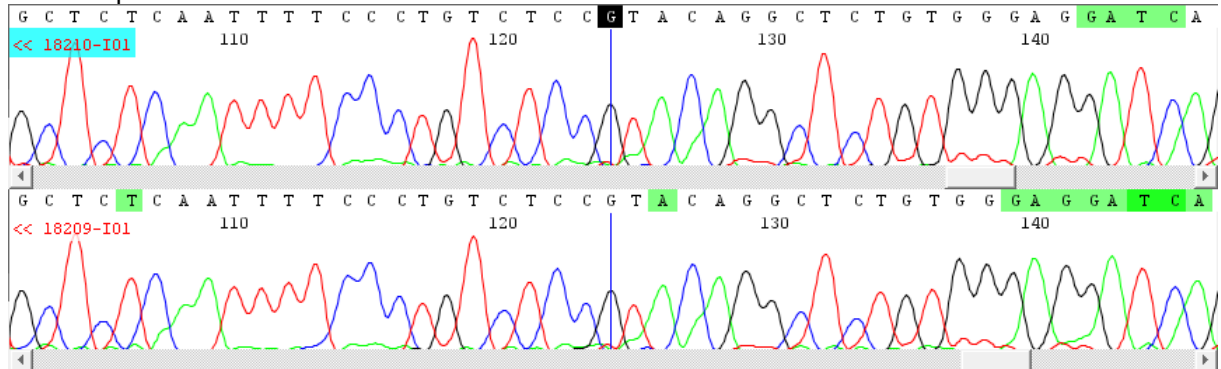
TABELA 22 - COMPARAÇÃO ENTRE PFEp E CTRL TOTALp DAS FREQUÊNCIAS OBTIDAS PARA O POLIMORFISMO 2741 G>A DO INTRON 9 DO GENE *RAGE*

Amostra Pareada Etnicamente				
		PFEp (236)	CTRL TOTALp (236)	P
Genótipos % (n)	GG	91,5 (216)	93,2 (220)	0,80
	GA	8,1 (19)	6,4 (15)	
	AA	0,4 (1)	0,4 (1)	
Alelos (%)	A	4,0	4,0	1,00
Portadores % (n)	G	99,6 (235)	99,6 (235)	0,60
	A	8,5 (20)	6,8 (16)	
HW (P)		0,37	0,26	

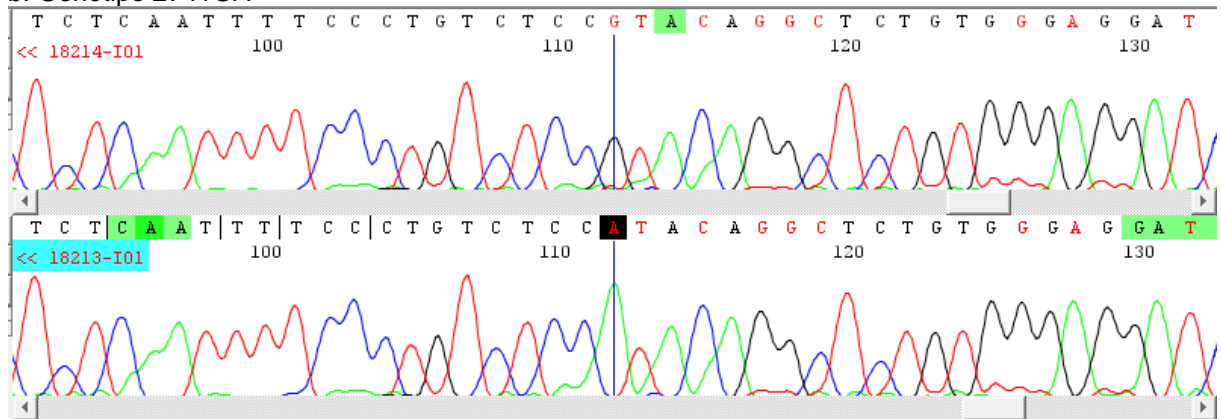
n: número de indivíduos; %: porcentagem de indivíduos; PFEp: indivíduos do grupo de pacientes de pênfigo foliáceo endêmico pareados etnicamente com o CTRL TOTALp; CTRL TOTALp: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2 pareados etnicamente com PFEp; P: probabilidade; HW (P): probabilidade do Equilíbrio de Hardy-Weinberg; GG, GA e AA: genótipos do polimorfismo 2741 G>A; G e A: alelos do polimorfismo 2741 G>A. Não foram encontradas diferenças significativas.

Finalmente, a genotipagem do SNP 2741 G>A através da reação PCR em Tempo Real com o sistema TaqMan<sup>®</sup> foi confirmada pela clonagem de uma amostra de cada genótipo (GG, GA e AA), e posterior seqüenciamento dos insertos de plasmídeos recombinantes de 3 clones da amostra com genótipo heterozigoto (GA) e, de 5 clones de amostras de indivíduos com genótipos homozigotos (GG e AA). Os eletroforetogramas da reação de seqüenciamento estão mostrados na Figura 20 (a, b e c).

## a. Genótipo 2741GG



## b. Genótipo 2741GA



## c. Genótipo 2741AA

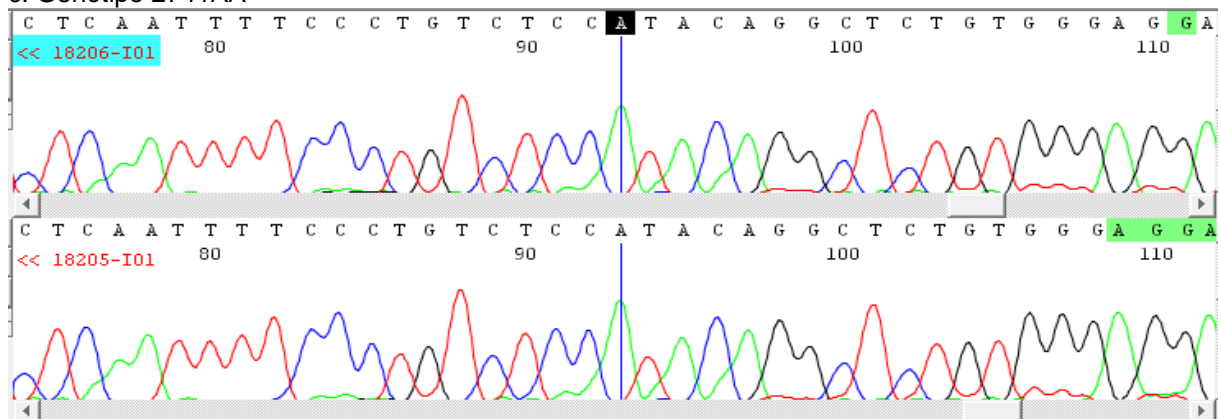


Figura 20. Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento de amostras da região do intron 9, evidenciando o SNP 2741 G>A. Cada amostra apresenta plasmídeos recombinantes de 2 clones diferentes, sendo que cada um porta um dos 2 alelos que forma os genótipos: a) GG; b) GA e; c) AA.

### 5.3 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE *RAGE*

Os polimorfismos do gene *RAGE* -429 T>C e -374 T>A + 63 pb del da região promotora, bem como o 2741 G>A do intron 9, foram também analisados através de um estudo de haplótipos, comparando as freqüências haplotípicas obtidas entre pacientes e controles em busca de associações com o pênfigo foliáceo endêmico.

Inicialmente foram comparadas as freqüências haplotípicas entre os subgrupos CTRL1 e CTRL2 (Tabela 23), para avaliar a possibilidade de comparação entre PFE e CTRL TOTAL, como foi feito para a análise individual de cada polimorfismo (item 4.2). Foi observada uma diferença significativa entre as freqüências entre CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 24). Portanto, as comparações entre pacientes e controles foram realizadas apenas com o subgrupo CTRL1-EB, para evitar associações espúrias (item 4.1.2).

Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre PFE-EB e CTRL1-EB, nem entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB (Tabela 24). Além disso, dos 12 haplótipos possíveis da combinação dessas posições, foram detectados apenas 7, descritos na Tabela 24.

TABELA 23 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBGRUPOS CTRL1 E CTRL2 DAS FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE *RAGE*

Haplótipos (-429T>C.-374T>A.2741G>A)	Euro-Brasileiros (EB) %		P	Afro-Brasileiros (AB) %		P
	CTRL1 (306)	CTRL2 (312)		CTRL1 (150)	CTRL2 (38)	
T T G	60,0	58,0		63,0	68,0	
T A G	27,0	31,0		21,0	24,0	
C T G	9,0	11,0	<b>0,03*</b>	11,0	5,0	0,81
T D A	4,0	0,4		5,0	3,0	
C D A	0,0	0,2		0,0	0,0	

%; porcentagem de indivíduos; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pênfigo; CTRL2: indivíduos do subgrupo controle do sul; P: probabilidade. \*As diferenças significativas estão marcadas em negrito.

Assim como observado na análise individual dos polimorfismos 63 pb del, -374 T>A e 2741 G>A, foi detectada uma diferença entre os subgrupos CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 23) tornando importante mais uma vez a comparação com a

amostra pareada etnicamente (item 4.1.3), PFEp e CTRL TOTALp (Tabela 25). Essa análise mostrou que as frequências haplotípicas obtidas para os grupos PFEp e CTRL TOTALp são estatisticamente similares. Os mesmos 7 haplótipos descritos na Tabela 23, dos 12 possíveis foram encontrados nesta análise.

TABELA 24 - COMPARAÇÃO ENTRE PFE E CTRL DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE *RAGE*

Haplótipos (-429T>C.-374T>A.2741G>A)	Euro-Brasileiros (EB) %		P	Afro-Brasileiros (AB) %		P
	PFE (288)	CTRL1 (306)		PFE (202)	CTRL TOTAL (188)	
CTG	6,2	9,5	0,37	6,7	9,6	0,39
CTA	0,0	0,0		0,5	0,0	
CDA	0,1	0,0		1,2	0,0	
TTG	59,8	59,8		60,1	64,4	
TAG	30,9	27,1		24,8	21,8	
TDG	0,3	0,0		0,0	0,0	
TDA	2,7	3,6		6,7	4,3	

%; porcentagem de indivíduos; PFE: indivíduos do grupo de portadores de pêfigo foliáceo endêmico; CTRL1: indivíduos do subgrupo controle de pêfigo; CTRL TOTAL: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2; P: probabilidade. Não foram encontradas diferenças significativas.

TABELA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE PFEp E CTRL TOTALp DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE *RAGE*

Haplótipos (-429T>C.-374T>A.2741G>A)	Amostra Pareada Etnicamente (%)		P
	PFEp (472)	CTRL TOTALp (472)	
CTG	6,6	9,5	0,23
CTA	0,2	0,0	
CDA	0,2	0,0	
TTG	59,7	61,7	
TAG	29,0	25,2	
TDG	0,2	0,0	
TDA	4,0	3,6	

%; porcentagem de indivíduos; PFEp: indivíduos do grupo de pacientes de pêfigo foliáceo endêmico pareados etnicamente com o CTRL TOTALp; CTRL TOTALp: indivíduos dos subgrupos CTRL1 e CTRL2 pareados etnicamente com PFEp; P: probabilidade. Não foram encontradas diferenças significativas.

As análises do desequilíbrio de ligação (Tabelas 26, 27 e 28) foram realizadas somando PFEp e CTRL TOTALp numa amostra total. Apesar desta escolha, é interessante notar que outras análises com a amostra, somando ou não os grupos Euro- e Afro-Brasileiros em uma amostra total, mostraram o mesmo padrão do coeficiente D'.

Os resultados obtidos revelaram um coeficiente D' com significância estatística ( $P < 0,05$ ) somente entre os pares dos polimorfismos -429 T>C e -374 T>A + 63 pb del, e entre -374 T>A + 63 pb del e 2741 G>A. A associação *cis*, ou seja, a ocorrência desses alelos juntos mais do que o esperado, ocorre entre os alelos -429C e -374T, -429T e -374A ou -374D (63 pb del), 2741G e -374T ou -374A, e 2741A e -374D (63 pb del).

TABELA 26 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E -374 T>A + 63 PB DEL EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE

Amostra Pareada Etnicamente (944)	-429 T>C			DL		
	T	C	D'	P	$r^2$	
-374 T>A	T	-	+	1,00	<b>&lt;0,0001*</b>	0,04
	A	+	-	1,00	<b>&lt;0,0001*</b>	0,03
	D	+	-	1,00	0,06	0,004

T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C; T, A e D: alelos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del; DL: desequilíbrio de ligação; D': coeficiente do desequilíbrio de ligação; P: probabilidade;  $r^2$ : coeficiente de correlação; +: associação *cis* entre os alelos; -: associação *trans* entre os alelos. \*D' com P significativo ( $P < 0,05$ ) está marcado em negrito.

TABELA 27 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE

Amostra Pareada Etnicamente (944)	2741 G>A			DL		
	G	A	D'	P	$r^2$	
-374 T>A	T	+	-	0,96	<b>&lt;0,0001*</b>	0,09
	A	+	-	1,00	<b>0,0001*</b>	0,02
	D	-	+	0,97	<b>&lt;0,0001*</b>	0,95

G e A: alelos do polimorfismo 2741 G>A; T, A e D: alelos do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del; DL: desequilíbrio de ligação; D': coeficiente do desequilíbrio de ligação; P: probabilidade;  $r^2$ : coeficiente de correlação; +: associação *cis* entre os alelos; -: associação *trans* entre os alelos. \*D' com P significativo ( $P < 0,05$ ) está marcado em negrito.

TABELA 28 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -429 T>C E 2741 G>A EM AMOSTRA PAREADA ETNICAMENTE

Amostra Pareada Etnicamente (944)	2741 G>A			DL		
	G	A	D'	P	$r^2$	
-429 T>C	T	-	+	0,19	0,68	0,002
	C	+	-	0,19	0,68	0,002

G e A: alelos do polimorfismo 2741 G>A; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C; DL: desequilíbrio de ligação; D': coeficiente do desequilíbrio de ligação; P: probabilidade;  $r^2$ : coeficiente de correlação; +: associação *cis* entre os alelos; -: associação *trans* entre os alelos. Não foram encontrados D' com P significativo ( $P > 0,05$ ).

#### 5.4 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE *RAGE* E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1

Estudos anteriores (Price et al., 1999; Laki et al., 2007) mostraram que o alelo -429C pertence ao haplótipo ancestral 8.1 (8.1 AH) de Caucasoídes, que inclui, entre outros, os alelos \*0301 do gene HLA-DRB1 e \*0201 de HLA-DQB1. O grupo do LGMH, em estudos anteriores, já havia genotipado os genes HLA-DRB1 e DQB1 na amostra em estudo e cedeu gentilmente esses dados para análise de haplótipos com o SNP -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*.

Uma vez que os genes HLA são freqüentemente associados a etnias (Probst et al., 2000), as análises foram realizadas entre PFE-EB e CTRL1-EB, minimizando associações espúrias com o pênfigo foliáceo endêmico. Outras razões favoreceram esta escolha: a amostra de Euro-Brasileiros é maior que Afro-Brasileiros, e os dados reportados na literatura (Price et al., 1999) sugerem que o haplótipo 8.1 AH é típico de Caucasoídes. As freqüências haplotípicas encontradas para PFE-EB e CTRL1-EB estão descritas na Tabela 29.

Os haplótipos -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*04.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 foram observados com freqüência significativamente mais alta no grupo PFE-EB quando comparado com CTRL1-EB. Os haplótipos -429T.DRB1\*07.DQB1\*02, -429T.DRB1\*11.DQB1\*03, -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 foram encontrados com freqüência significativamente mais alta em CTRL1-EB quando comparado com PFE-EB. Na amostra estudada, as freqüências do haplótipo -429C.DRB1\*03.DQB1\*02 (8.1 AH) se mostraram estatisticamente similares entre PFE-EB e CTRL1-EB, no entanto, uma tendência à associação negativa ao pênfigo foliáceo endêmico é observada pelos valores  $P=0,12$ ,  $OR=0,27$  [0,06-1,27]. É interessante notar que comparando PFE-EB e CTRL TOTAL-EB, a tendência de o haplótipo 8.1 AH estar associado negativamente ao pênfigo foliáceo endêmico se torna ainda mais próxima do limiar de significância:  $P=0,06$ ,  $OR=0,25$  [0,06-1,06].

TABELA 29 – HAPLÓTIPOS FORMADOS PELO POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE *RAGE* E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1 ENTRE PFE-EB E CTRL1-EB

Haplótipos (-429T>C.HLA-DRB1.HLA-DQB1)	Euro-Brasileiros (EB) %				
	PFE (222)	CTRL1 (278)	P	OR	IC 95%
C 03 02*	0,9	3,2	0,12	0,27	0,06-1,27
C 03 05	0,5	0,0			
C 04 03	1,4	0,0			
C 07 02	0,5	1,8			
C 07 03	0,0	1,5			
C 08 03	0,5	0,0			
C 08 04	0,7	0,0			
C 10 05	0,3	0,0			
C 11 03	0,0	0,5			
C 13 02	0,0	0,4			
C 13 03	0,0	1,0			
C 13 05	0,9	0,7			
C 14 03	0,4	0,0			
C 14 05	0,0	0,4			
C 14 06	0,0	0,4			
C 15 06	0,5	0,0			
C 16 03	0,3	0,4			
T 01 03	0,5	0,0			
<b>T 01 05**</b>	<b>29,2</b>	<b>10,8</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>3,42</b>	<b>2,13-5,51</b>
T 01 06	0,5	0,0			
T 03 02	1,4	4,3			
T 03 04	0,9	1,1			
T 03 06	0,0	0,7			
T 04 02	0,5	0,4			
<b>T 04 03**</b>	<b>26,0</b>	<b>11,5</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>2,72</b>	<b>1,69-4,37</b>
T 04 04	1,8	0,4			
T 04 05	0,5	0,0			
<b>T 07 02**</b>	<b>0,0</b>	<b>8,6</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00-0,39</b>
T 07 03	0,5	0,4			
T 08 03	0,0	1,4			
T 08 04	2,4	4,3			
T 08 06	0,0	0,7			
T 09 03	0,5	0,7			
T 10 05	1,9	1,8			
<b>T 11 03**</b>	<b>0,0</b>	<b>10,7</b>	<b>&lt;0,000001</b>	<b>0,02</b>	<b>0,00-0,30</b>
T 11 06	0,0	1,1			
T 12 03	0,4	0,4			
T 12 05	0,5	0,4			
T 13 02	0,0	0,4			
T 13 03	0,9	0,8			
T 13 05	0,9	1,1			
<b>T 13 06**</b>	<b>5,4</b>	<b>11,9</b>	<b>0,01</b>	<b>0,42</b>	<b>0,21-0,84</b>
T 14 03	1,4	1,8			
T 14 05	1,8	1,8			
T 15 03	0,0	0,4			
T 15 05	0,5	0,0			
T 15 06	4,5	9,0			
T 16 03	3,3	0,7			
<b>T 16 05**</b>	<b>7,2</b>	<b>2,5</b>	<b>0,02</b>	<b>3,01</b>	<b>1,21-7,44</b>

PFE: Euro-Brasileiros do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; CTRL1: Euro-Brasileiros do subgrupo controle de pênfigo; P: probabilidade; OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. \*Haplótipo ancestral 8.1. \*\*As diferenças significativas entre PFE-EB e CTRL1-EB estão marcadas em negrito.

A análise de desequilíbrio de ligação entre os pares de alelos destas posições que apresentaram  $D'$  com  $P < 0,05$  está descrita nas Tabelas 30, 31 e 32. Os resultados obtidos para o desequilíbrio de ligação nos quais foram observados um  $D'$  com  $P > 0,05$  não foram descritos em tabelas. Essa análise mostrou associação *cis* entre os alelos do haplótipo 8.1 AH, -429C, HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02, em todos os grupos PFE-EB e CTRL1-EB.

Em relação aos outros alelos HLA-DRB1 e DQB1, não houve um padrão de associação *cis* entre os grupos PFE-EB e CTRL1-EB, e por essa razão a análise dos grupos foi realizada separadamente. Além dos alelos do haplótipo 8.1 AH (-429C.DRB1\*03.DQB1\*02), apenas o alelo HLA-DRB1\*07 ligado ao alelo -429C foi encontrado em ambos os grupos (PFE-EB e CTRL1-EB). A associação *cis* entre os alelos HLA-DRB1\*01 e -429T está no limite de significância ( $P = 0,05$ ) no subgrupo CTRL1-EB (Tabela 31), mas em PFE-EB (Tabela 30) é significativo ( $P < 0,05$ ).

Além disso, em PFE-EB (Tabela 30) foi também observada uma associação *cis* entre -429C e HLA-DRB1\*08. No subgrupo CTRL1 (Tabela 31) foi encontrada uma associação *cis* entre os alelos -429T e HLA-DRB1\*04, e -429T e DQB1\*06. O coeficiente  $D'$  encontrado entre HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02 foi de 0,7036 ( $P < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,4312$ ) no grupo PFE-EB e 0,7624 ( $P < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,2546$ ) em CTRL1-EB.

TABELA 30 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE -429 T>C, HLA-DRB1 E HLA-DQB1 EM PFE-EB

PFE-EB (222)	-429 T>C		DL			
	T	C	$D'$	P	$r^2$	
HLA-DRB1	01	+	-	1,00	0,01	0,03
	<b>03</b>	-	<b>+</b>	<b>0,33</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,05</b>
	07	-	+	0,46	0,02	0,02
	08	-	+	0,33	<0,001	0,05
HLA-DQB1	<b>02</b>	-	<b>+</b>	<b>0,38</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,06</b>

PFE-EB: Euro-Brasileiros do grupo de portadores de pênfigo foliáceo endêmico; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C do gene *RAGE*; 01, 03, 07 e 08: alelos do gene HLA-DRB1; 02: alelo do gene HLA-DQB1; DL: desequilíbrio de ligação;  $D'$ : coeficiente do desequilíbrio de ligação; P: probabilidade;  $r^2$ : coeficiente de correlação; +: associação *cis* entre os alelos; -: associação *trans* entre os alelos. Em negrito estão destacados os alelos DRB1\*03 e DQB1\*02, pertencentes ao haplótipo 8.1 AH.



TABELA 31 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE -429 T>C, HLA-DRB1 E HLA-DQB1 EM CTRL1-EB

CTRL1-EB <sup>(278)</sup>	-429 T>C		DL			
	T	C	D'	P	r <sup>2</sup>	
HLA-DRB1	01	+	-	1,00	0,05*	0,01
	<b>03</b>	-	<b>+</b>	<b>0,27</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,07</b>
	04	+	-	1,00	0,04	0,02
	07	-	+	0,23	<0,001	0,04
HLA-DQB1	<b>02</b>	-	<b>+</b>	<b>0,43</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,09</b>
	06	+	-	0,85	0,01	0,03

CTRL1: Euro-Brasileiros do subgrupo controle de pênfigo; T e C: alelos do polimorfismo -429 T>C do gene *RAGE*; 01, 03, 04 e 07: alelos do gene HLA-DRB1; 02 e 06: alelos do gene HLA-DQB1; DL: desequilíbrio de ligação; D': coeficiente do desequilíbrio de ligação; P: probabilidade; r<sup>2</sup>: coeficiente de correlação; +: associação cis entre os alelos; -: associação trans entre os alelos. Em negrito estão destacados os alelos DRB1\*03 e DQB1\*02, pertencentes ao haplótipo 8.1 AH. \*D' com P no limiar da significância (P = 0,05).

## 5.5 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES

### 5.5.1 Polimorfismo de conformação de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* ou SSCP) do produto de PCR da região promotora do gene *RAGE*

A reação de SSCP foi realizada para identificar mutações potencialmente novas no produto de PCR da região promotora (344 pb) nas amostras que foram inicialmente identificadas com um perfil eletroforético anômalo em gel de poliacrilamida 8% (20:1) após a reação de PCR-RFLP da região promotora com a enzima AluI (item 4.3.2). A Figura 21 mostra um gel de poliacrilamida 8% (20:1) com os perfis eletroforéticos do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* das amostras 52, 476, 646 e 688.

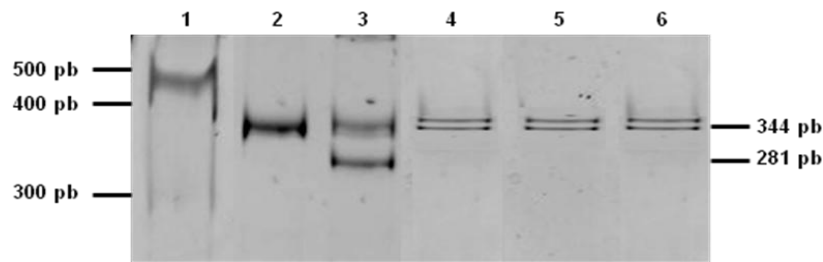


Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (20:1) do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE*, em tampão TBE 1x e corado com brometo de etídeo. Linha 1: amostra 52; Linhas 2 e 3: controles do padrão de tamanho do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* (genótipos II e ID, respectivamente); Linha 4, 5 e 6: amostras 476, 646 e 688, respectivamente.

A amostra 52 apresentou uma única banda entre 400 e 500 pb, sugerindo uma possível inserção em homozigose. As amostras 476, 646 e 688 apresentaram um padrão eletroforético similar, com uma banda de 344 pb (produto de PCR da região promotora) e uma banda um pouco menor, sugerindo a existência de uma pequena deleção em heterozigose com a inserção (produto de PCR da região promotora).

A Figura 22 é um gel de poliacrilamida 8% (29:1) com as mesmas amostras (52, 476, 646 e 688) após a reação de PCR-SSCP (item 4.4.1). As amostras 52 e 688 apresentaram padrão eletroforético idêntico entre si nestas condições desnaturantes. As amostras 476 e 646 exibiram perfil eletroforético diferenciado das outras e similar entre si.

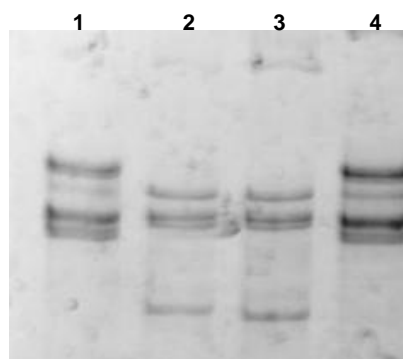


Figura 22. Reação de PCR-SSCP. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (29:1) com tampão TBE 0,5x e corado com brometo de etídeo do produto de PCR da região promotora (344 pb) das amostras 52, 476, 646 e 688. Linhas 1, 2, 3 e 4: amostras 52, 476, 646 e 688, respectivamente.

### 5.5.2 Clonagem e seqüenciamento do produto de PCR da região promotora do gene *RAGE*

Os produtos de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* das amostras heterozigotas (476, 646 e 688) também foram clonados e seqüenciados (item 4.4). De cada amostra analisada, pelo menos 5 clones contendo plasmídeos recombinantes foram seqüenciados.

Em duas amostras, 476 e 646, foi encontrada uma deleção de 2 pb (CT) em heterozigose com a inserção, que possui seqüência idêntica ao consenso do produto de PCR (344 pb) da região promotora do gene *RAGE*. Portanto, esta é uma deleção de um dinucleotídeo na posição -510\_-509delCT. O alinhamento e os eletroforetogramas da reação de seqüenciamento dessas amostras estão representados na Figura 23 (a e b, respectivamente).

a. Alinhamento das seqüências obtidas para o produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* das amostras 476 e 646

```

AAAAAAAAACAAAATGCAGTTTTTAAATAAAGAAATTT- TTTTTCCCTGGGTTTAGTTGAGAAATTTTTTCAAAAAA
AAAAAAAAACAAAATGCAGTTTTTAAATAAAGAAATTTCTTTTTCCCTGGGTTTAGTTGAGAAATTTTTTCAAAAAA
  
```

b. Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento da região promotora do gene *RAGE* das amostras 476 e 646

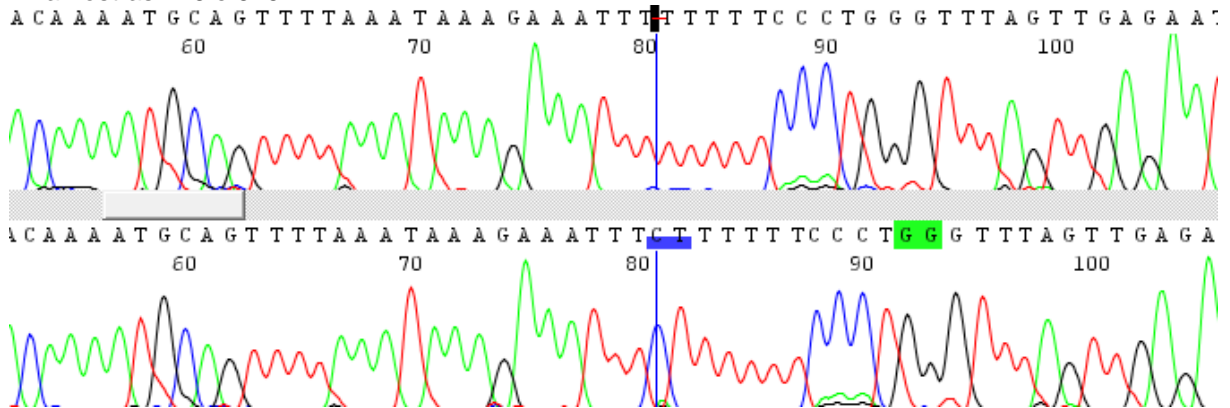


Figura 23. Reação de seqüenciamento do produto de PCR da região promotora (344pb) do gene *RAGE*. a) Alinhamento das seqüências obtidas. b) Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento. Cada amostra apresenta plasmídeos recombinantes de 2 clones, sendo que cada clone porta um dos 2 alelos que forma o genótipo. O primeiro clone apresenta o alelo -510\_-509delCT, e o segundo clone apresenta o alelo selvagem -510\_-509insCT, formando em cada amostra o genótipo heterozigoto.

As amostras 476 e 646 apresentaram seqüências idênticas do produto de PCR (344 pb) da região promotora do gene *RAGE*, inclusive com os mesmos haplótipos dos polimorfismos presentes: (1) -510\_-509insCT.-429C.-374T e (2) -510\_-509delCT.-429T.-374A.

O produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* da amostra 52 não foi clonado visto que o indivíduo é aparentemente homocigoto para a mutação em potencial (apenas uma banda). Portanto, o produto de PCR foi diretamente seqüenciado após tratamento com as enzimas Exol e SAP. A seqüência obtida foi idêntica à depositada no banco de dados, apresentando os genótipos -429TC e -374TT. Não foi possível obter as seqüências dos clones da amostra 688.

Produtos de PCR da região promotora do gene *RAGE* de dois indivíduos de uma amostra de diabéticos tipo 1 estudada por Picheth (2007) utilizando PCR-SSCP também apresentaram padrões de migração eletroforética distintos dos usuais. Para tentar identificar as possíveis mutações nestas amostras, seus produtos de PCR também foram clonados e pelo menos 5 plasmídeos recombinantes de cada amostra foram seqüenciados. Ambas apresentaram a mutação -510\_-509delCT, idêntica a das amostras 476 e 646, na região promotora do gene *RAGE* (Figura 23).

### 5.5.3 Clonagem e seqüenciamento do produto de PCR da exon 3 do gene *RAGE*

Produtos de PCR do exon 3 (397 pb) do gene *RAGE* de três indivíduos também da amostra de diabéticos tipo 1 estudada por Picheth (2007) apresentaram padrões de migração eletroforética distintos dos usuais em PCR-SSCP. Para tentar identificar as possíveis novas mutações nestas amostras, seus produtos de PCR também foram clonados e pelo menos 5 plasmídeos recombinantes de cada amostra foram seqüenciados. Nestas três amostras foi encontrada uma transição de citosina para timina na posição 540 (Figura 24) do exon 3 do gene *RAGE*. Esta mutação é responsável pela substituição não-sinônima do resíduo de arginina, para cisteína (R77C) na posição 77 do receptor *RAGE* (Figura 25).

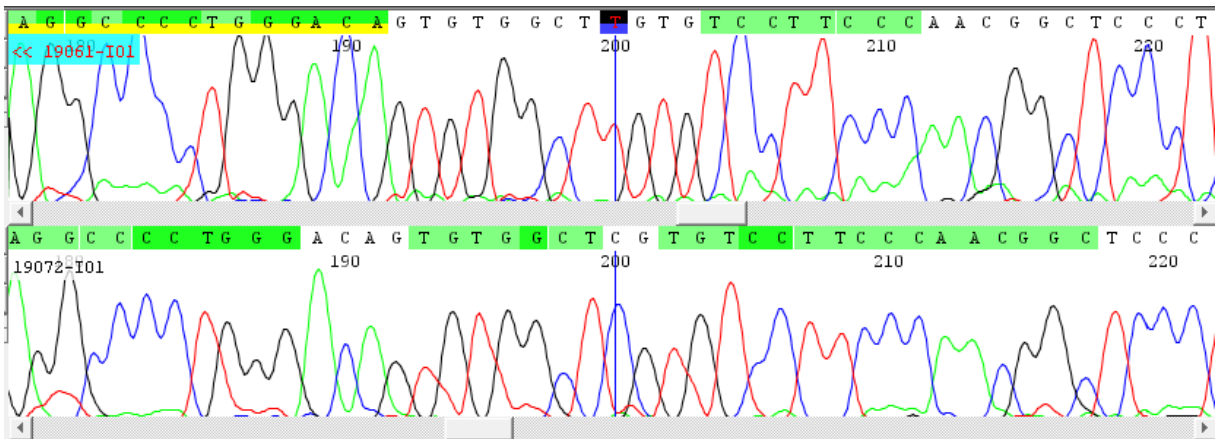


Figura 24. Eletroforetogramas da reação de seqüenciamento do exon 3 do gene *RAGE*. Evidenciando amostras que apresentaram padrão eletroforético diferenciado em gel de poliacrilamida 8% (29:1) após reação de SSCP. Em destaque está a transição de citosina para timina na posição 540 (540 C>T). Cada amostra apresenta 2 plasmídeos recombinantes, sendo que cada um porta um dos 2 alelos (C ou T) que forma os genótipos 540CC, 540CT e 540TT.

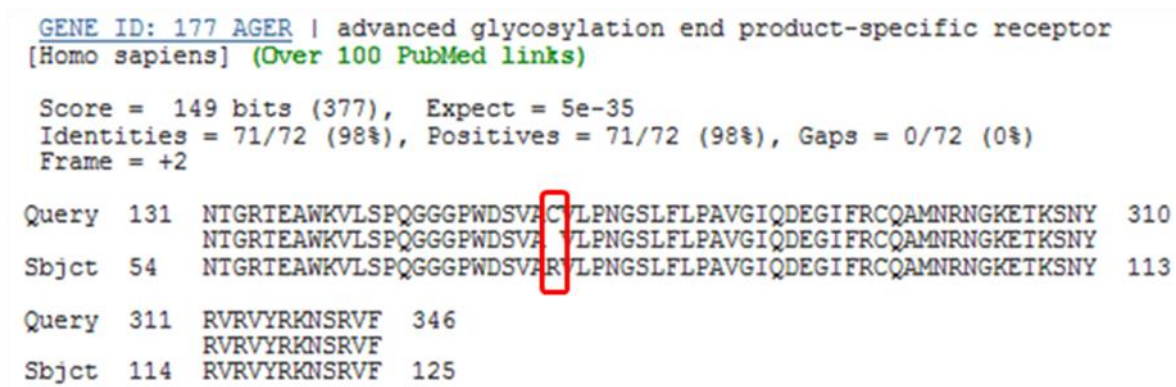


Figura 25. Alinhamento de parte da seqüência de aminoácidos codificado pelo exon 3 do gene *RAGE*. Evidenciando a mutação 540 C>T no exon 3 com a seqüência normal, que resulta em substituição não-sinônima do aminoácido 77 do receptor RAGE, de arginina para cisteína (R77C).

## 6. DISCUSSÃO

O pênfigo foliáceo endêmico é uma doença auto-imune complexa mediada por auto-anticorpos específicos para a Dsg1, uma glicoproteína desmossomal (Amagai, 1995) e é caracterizado por bolhas e erosões na pele (Veldman e Feliciani, 2007). No Brasil o pênfigo foliáceo ocorre de forma endêmica em áreas rurais, principalmente no Centro-Oeste (Hans-Filho et al., 1999).

Alelos dos genes HLA, integrantes do complexo principal de histocompatibilidade de classes I e II (MHC Classes I e II), têm sido associados à susceptibilidade ou resistência ao pênfigo foliáceo endêmico (Petzl-Erlor e SantaMaria, 1989; Pavoni et al. 2003). Também foram detectadas associações das variantes genéticas -590 C>T da interleucina 4 e -174 G>C da interleucina 6 com o PFE (Pereira et al., 2004). Por outro lado, os polimorfismos 809 C>T e 1660 G>A do auto-antígeno DSG1 não estão associados com o PFE (Malheiros, 2003). Uma fraca associação entre o PFE e o alelo PD1.6A do gene PDCD1 (*programmed cell death 1 molecule*) foi encontrada em Euro-Brasileiros (Braun-Prado e Petzl-Erlor, 2007).

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE), presente nas membranas e membro da superfamília das imunoglobulinas, é codificado pelo gene *RAGE* localizado no cromossomo 6p21.3 no MHC III, posicionado entre MHC I e II (Sugaya et al., 1994). Estudos recentes mostraram que o alelo -429C do gene *RAGE* faz parte de um haplótipo que inclui alelos HLA, o haplótipo 8.1 AH (Laki et al., 2007). Este haplótipo tem sido associado com uma plêiade de doenças imunológicas (Price et al., 1999).

O receptor RAGE é capaz de reconhecer múltiplos ligantes e aparentemente está envolvido em um amplo espectro de eventos fisiopatológicos (Stern et al., 2002). A função deste receptor em condições fisiológicas normais ainda não é conhecida em detalhes. No entanto, estudos recentes (Zhou et al., 2006) sugeriram uma função regulatória para RAGE na maturação e função de osteoclastos. Por outro lado, a ativação do receptor RAGE, através da interação com seus ligantes, desencadeia por transdução de sinal uma cascata de eventos intracelulares que promovem resposta inflamatória, estado de pró-coagulação, geração de espécies reativas de oxigênio e inclusive modificação da expressão gênica com indução da

transcrição do próprio gene *RAGE* (Lapolla et al., 2005). Em condições nas quais o receptor *RAGE* é persistentemente ativado, como presumivelmente ocorre em pacientes diabéticos, o receptor *RAGE* atua como um propagador de disfunções celulares (Schmidt et al., 2000; Hudson et al., 2002).

As características muito distintas dos ligantes de *RAGE*, como as beta-fibrilas presentes na doença de Alzheimer, os polipeptídeos S100/calgranulinas e os AGEs, ambos envolvidos no processo inflamatório, 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 (Schmidt et al., 2000; Stern et al., 2002). A importância de *RAGE* é também ressaltada por estudos que mostraram o efeito do *RAGE* solúvel (s*RAGE*), uma isoforma C-truncada de *RAGE* que perdeu o sítio de ancoragem na membrana celular e circula no plasma, reduzindo a intensidade do processo inflamatório e das complicações associadas ao diabetes em roedores, possivelmente por seqüestrar os ligantes de *RAGE*, não permitindo que estes atinjam o receptor na membrana e, conseqüentemente, o desenvolvimento de efeitos patológicos (Ding e Keller, 2005).

Os estudos de associação de variantes do gene *RAGE* com processos patológicos têm mostrado resultados conflitantes. Enquanto alguns estudos não identificaram associações em particular com o diabetes e função renal (Globocnick et al., 2003; Jixiong et al., 2003; Kanková et al., 2005; Naka et al., 2006), outros têm relacionado polimorfismos de *RAGE* principalmente com complicações do diabetes, processos inflamatórios, aterosclerose e doença coronariana (Pettersson-Fernholm et al., 2003; Falcone et al., 2005; Picheth et al., 2007 a e b).

Deste modo, o gene *RAGE* foi escolhido como candidato deste estudo caso *versus* controle para investigação de associação ao pênfigo foliáceo endêmico, tanto pelos efeitos já descritos de sua atividade como receptor quanto por refletir os efeitos de um alelo em associação primária com a doença devido a um desequilíbrio de ligação com *RAGE*, como é o caso de alguns alelos dos genes HLA.

## 6.1 AMOSTRA POPULACIONAL

### 6.1.1 Composição da amostra

Freqüentemente são registradas associações divergentes entre polimorfismos e processos patológicos de etiologia complexa em diferentes estudos (Willett et al., 2002). Alguns dos fatores que contribuem para este fenômeno estão relacionados à amostragem populacional como, por exemplo, o uso de amostras com poucos indivíduos, a escolha de grupos controle inapropriados, além de falhas ao coletar informações dos fatores ambientais que podem modificar a relação entre genótipo e doença. Neste trabalho, estes fatores foram minimizados a fim de obter resultados consistentes.

Uma das principais razões que podem conduzir a associações espúrias entre as variantes genéticas e doenças é a existência de diferenças das freqüências dos alelos estudados entre subgrupos populacionais ou se estes estiverem representados desigualmente nos grupos de pacientes e controles. As diferenças nas freqüências alélicas entre grupos étnicos podem influenciar os resultados e conclusões dos estudos de associação por dois motivos: (1) a freqüência do alelo associado num grupo pode estar muito baixa ou mesmo ausente em outros grupos étnicos; (2) a associação com a variante pode ocorrer em vários grupos, no entanto o risco relativo conferido pelo alelo pode diferir entre os grupos (Petzl-Erler, 1999). Assim, a amostra estudada foi dividida em dois subgrupos de acordo com a composição étnica: indivíduos de origem predominantemente européia (EB) e indivíduos de origem mestiça predominantemente africana e européia (AB).

As comparações foram realizadas considerando-se estes dois subgrupos populacionais que compõem a amostra. Quando as diferenças de freqüências genotípicas, alélicas, de portadores e haplotípicas foram estatisticamente significativas entre os grupos étnicos, os grupos de pacientes com pênfigo e controle foram pareados em relação à composição étnica (item 4.1).



### 6.1.2 Caracterização da amostra

O Centro-Oeste foi a região do Brasil na qual foi registrada a maior frequência de aparecimento das lesões primárias características do pênfigo foliáceo endêmico na amostra estudada (Figura 15). Esses resultados refletem a região na qual as amostras deste estudo foram coletadas.

A idade média de aparecimento das lesões primárias características do pênfigo foliáceo endêmico no grupo PFE deste estudo foi de  $32,9 \pm 16,3$  anos (item 5.1). Esta idade média é menor que as descritas em outros estudos: 54 anos na Itália (Naldi et al., 1993),  $36,7 \pm 15,7$  anos na Tunísia e  $52,0 \pm 18,1$  anos na França (Bastuji-Garin et al., 1995), 43 anos na África do Sul (Aboobaker et al., 2001), 40 anos na Arábia Saudita (Tallab et al., 2001), 53 anos na Croácia (Ljubojevic et al., 2002), 44,3 anos na Coreia (Seo et al., 2003) e  $42,0 \pm 19,0$  anos em pacientes do Irã (Chams-Davatchi et al., 2004). O reconhecimento de áreas endêmicas para o PFE no Brasil por autoridades sanitárias e mesmos por pesquisadores pode ter influenciado a detecção precoce das lesões primárias em comparação com os demais estudos.

A proporção mulheres:homens (Figura 17) encontrada em PFE neste estudo foi de 1,25:1. Em outras populações, esta proporção foi descrita como: 1,43:1 na Itália (Naldi et al., 1993), 4:1 na Tunísia e 1:2 na França (Bastuji-Garin et al., 1995), 1,4:1 na África do Sul (Aboobaker et al., 2001), 2,2:1 na Arábia Saudita (Tallab et al., 2001), 2:1 na Croácia (Ljubojevic et al., 2002), 1,3:1 na Coreia (Seo et al., 2003) e 1,5:1 no Irã (Chams-Davatchi et al., 2004). Portanto, neste quesito, a população brasileira em estudo assemelha-se à coreana, sul-africana e iraniana. Também, a maioria dos estudos aponta para uma predominância de mulheres entre os afetados.

Os resultados obtidos por Bastuji-Garin et al. (1995) na Tunísia, outra região onde o pênfigo foliáceo é endêmico, mostraram um padrão semelhante àquele observado neste trabalho, pois aqueles autores encontraram uma maior incidência em mulheres (4:1) jovens ( $36,7 \pm 15,7$  anos). Nas amostras deste estudo, apesar da relação mulheres:homens ser próxima de 1:1 no grupo PFE (Figura 17), a idade média neste grupo é  $32,9 \pm 16,3$  anos (item 5.1), ou seja, há uma maior incidência de pênfigo foliáceo em jovens na amostra estudada quando comparado com outras populações. Outra característica coincidente entre os casos de pênfigo na Tunísia e

no Brasil é a maior incidência em áreas rurais. Por outro lado, dois fatores são diferentes nestas regiões endêmicas: (1) a presença de casos de pênfigo foliáceo em crianças (abaixo de 15 anos) em nosso estudo foi de 11,1% (Figura 16), e na Tunísia foi encontrado apenas um caso de um total de 198 indivíduos (0,51%) e; (2) na amostra estudada, 88,8% dos pacientes de pênfigo possuíam familiar afetado (item 5.1), enquanto na Tunísia não foram observados casos em famílias.

Algumas diferenças em relação à ocupação e ao grau de instrução entre os indivíduos do subgrupo CTRL2 e os grupos PFE e CTRL1 refletem as regiões de residência dos indivíduos destes grupos e também a forma de abordagem dos participantes. Os integrantes do subgrupo CTRL1, normalmente, eram acompanhantes dos pacientes do grupo PFE. Este fator foi importante para garantir a homogeneidade da origem étnica, geográfica e ocupação, do subgrupo CTRL1 em relação ao grupo PFE. Por outro lado, o grupo CTRL2 foi formado principalmente por indivíduos abordados na Universidade Federal do Paraná e como seus familiares.

Devido à importância do fator ambiental no desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico o grupo controle deve estar pareado com o de pacientes no que diz respeito à origem geográfica e ocupação. Os dados epidemiológicos da amostra estudada (item 5.1) evidenciam as diferenças dos fatores ambientais entre CTRL2 e os grupos PFE e CTRL1, enfatizando a necessidade da divisão do grupo CTRL TOTAL em CTRL1 e CTRL2, a não ser que as frequências genotípicas, alélicas, de portadores e haplotípicas sejam estatisticamente similares (item 4.1.2). Uma vez que polimorfismos podem estar associados à etnia e considerando que a população brasileira é muito miscigenada, é essencial minimizar a possibilidade de associações espúrias ao pênfigo foliáceo endêmico. Por isso, é importante a realização de análises com uma amostra pareada etnicamente (item 4.1.3; PFEp e CTRL TOTALp), além de fornecer maiores informações relativas à distribuição das frequências dos polimorfismos na amostra estudada.

## 6.2 GENOTIPAGEM

Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) podem causar modificação da seqüência de resíduos de aminoácidos na proteína ou na expressão gênica

podendo, portanto, podem participar de mudanças bioquímicas e fisiopatológicas importantes. Os polimorfismos do gene *RAGE* têm sido relacionados com susceptibilidade genética às complicações do diabetes, além da possível associação com outras patologias, como a doença de Alzheimer (Hudson et al., 2002). Os SNPs -429 T>C e -374 T>A da região promotora são funcionais, pois causam um aumento da expressão de *RAGE* (Hudson et al., 2001); e o SNP 2741 G>A do intron 9, pode estar envolvido com *splicing* alternativo do transcrito primário de *RAGE*. O polimorfismo 63 pb del da região promotora também causa alterações importantes na expressão de *RAGE* (Hudson et al., 2001).

Para todos estes polimorfismos analisados neste estudo, os resultados obtidos na genotipagem de amostras de orientais e indígenas foram apenas citados devido ao número insuficiente de indivíduos destas etnias para realizar comparações com poder estatístico. Portanto, o estudo de associação foi realizado entre pacientes e controle em Euro- e Afro-Brasileiros. Nestes, as freqüências observadas para todos os polimorfismos analisados se distribuíram conforme o esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

#### 6.2.1 Análise de associação individual do polimorfismo 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*

Em estudos anteriores da região promotora do gene *RAGE* em Caucásóides (Hudson et al., 2001; Schenk et al., 2001; Kanková et al., 2005), o polimorfismo 63 pb del foi encontrado em um número muito reduzido de indivíduos (<1%). Por outro lado, em uma amostra de diabéticos tipo 2 investigada por Santos et al. (2005) foram encontradas freqüências alélicas mais altas do polimorfismo 63 pb del em Euro- (2,0%) e Afro-Brasileiros (4,0%). Estudos populacionais recentes (Torres, 2007) sugerem que o polimorfismo 63 pb del ocorre mais freqüentemente ( $P<0,05$ ) em Afro-Brasileiros (3,8%) quando comparados com Euro-Brasileiros (<1%).

No presente estudo, para avaliar a pertinência de usar o grupo CTRL TOTAL (unindo os subgrupos CTRL1 e CTRL2) nas comparações com o grupo PFE, inicialmente foi realizada uma comparação entre CTRL1 e CTRL2 (Tabela 11). Foi determinado que CTRL1-EB e CTRL2-EB possuem freqüências genotípicas, alélicas ( $P=0,02$ ) e de portadores ( $P=0,04$ ) do polimorfismo 63 pb del diferentes, enquanto

CTRL1-AB e CTRL2-AB se mostraram similares ( $P=1,0$ ). A fim de evitar associações espúrias ao pênfigo foliáceo endêmico e de garantir o pareamento dos fatores ambientais pela importância destes no desencadeamento da doença, prosseguiu-se às análises de associação entre PFE-EB e CTRL1-EB, e PFE-AB e CTRL2-AB (Tabela 12). Nestas análises não foi observada associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 63 pb del ( $P>0,12$ ). A comparação entre pacientes e controles da amostra pareada etnicamente (Tabela 13) foi realizada, não sendo observada associação significativa entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 63 pb del ( $P>0,60$ ).

A diferença encontrada das frequências genotípicas, alélicas e de portadores do polimorfismo 63 pb del entre CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 11) e, entre PFE-EB e PFE-AB (item 5.2.1), sugere que a classificação étnica utilizada não é perfeita. As dificuldades na classificação étnica com base observacional são reconhecidas em vários trabalhos envolvendo genética de populações e, na amostra em estudo foram potencializados pela maior miscigenação observada em indivíduos da Região Centro-Oeste em relação à população do Sul do Brasil, o que torna o grupo Euro-Brasileiros menos homogêneo etnicamente na Região Centro-Oeste quando comparado ao da Região Sul. Neste contexto, os dados obtidos corroboram a maior frequência do polimorfismo 63 pb del em Afro- quando comparado a Euro-Brasileiros como anteriormente descrito por Torres (2007).

#### 6.2.2 Análise de associação individual do polimorfismo -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*

Variantes genéticas na região promotora do gene *RAGE* têm sido alvos importantes das pesquisas porque podem alterar a concentração e atividade do receptor RAGE (Hudson et al. 2002). O alelo -429C aumenta, em estudos *in vitro*, em até duas vezes a transcrição do gene *RAGE* (Hudson et al., 2001). Os resultados obtidos em estudos de associação do polimorfismo -429T>C sugerem que o alelo -429C está associado com retinopatia em diabéticos tipo 2 (Hudson et al., 2004) e nefropatia em diabéticos (Kanková et al., 2005). Em um estudo populacional em amostra brasileira foram obtidas frequências similares do alelo -429C ( $\approx 12,0\%$ ) em Euro- e Afro-Brasileiros (Torres, 2007).

No presente estudo, para avaliar a consistência do uso do grupo CTRL TOTAL nas comparações com o grupo PFE, inicialmente foi realizada uma análise entre CTRL1 e CTRL2, na qual foi determinado que tanto CTRL1-EB e CTRL2-EB quanto CTRL1-AB e CTRL2-AB são similares entre si para o polimorfismo -429 T>C (Tabela 14;  $P \geq 0,29$ ). Estes resultados permitiram que as análises de associação fossem conduzidas entre PFE-EB e CTRL TOTAL-EB e, entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB (Tabela 15). Nestas análises foi encontrada uma associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o alelo -429C em Euro-Brasileiros ( $P=0,04$ ). Esta fraca associação sugere que o alelo -429C confere proteção de cerca de 50% para o desenvolvimento da doença ( $OR=0,61$  [0,34-1,07]). Finalmente, em uma comparação entre pacientes e controles da amostra pareada etnicamente (Tabela 16) não foi encontrada associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo -429 T>C ( $P \geq 0,14$ ).

Esses resultados sugerem que o alelo -429C pode conferir proteção ao pênfigo foliáceo endêmico. A baixa frequência do alelo -429C na população ( $\approx 8\%$ ) é um fator que dificulta os estudos de associação com doenças. Estudos com amostras maiores são essenciais para esclarecer a associação entre o alelo -429C e o pênfigo foliáceo endêmico. Também é possível concluir que o efeito do alelo -429C no desenvolvimento da doença é pouco significativo em termos populacionais, pela fraca associação observada associada à baixa frequência na população.

### 6.2.3 Análise de associação individual do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del da região promotora do gene *RAGE*

A substituição T>A na posição -374 da região promotora modifica o sítio de ligação a um complexo de proteínas repressoras da transcrição de *RAGE*, aumentando a expressão do gene *RAGE* em até três vezes (Hudson et al., 2001). Schenk et al. (2001) relataram que o alelo -374A está associado com aumento da frequência de câncer de células pulmonares não-pequenas (*non-small cell lung cancer*). Além disso, o alelo -374A está associado a um efeito protetor contra o desenvolvimento de doença coronariana (Pettersson-Fernholm et al., 2003; Falcone et al., 2004; Santos et al., 2005). As frequências do alelo -374A em Euro- (31,5%) e Afro-Brasileiros (25,3%) saudáveis descritas por Torres (2007), se mostraram

diferentes das reportadas por vários estudos em indivíduos saudáveis (Hudson et al., 2001; Jixiong et al., 2003; Falcone et al., 2004; Kanková et al., 2005)

Um dado importante a ser considerado é que o polimorfismo 63 pb del engloba a região do SNP -374 T>A (item 4.3.3), o que faz com que essa posição esteja ausente quando a deleção está presente em homozigose ou ainda, presente de forma haplóide quando a deleção está em heterozigose. Em estudos anteriores da região promotora do gene *RAGE* em Caucásios (Hudson et al., 2001; Schenk et al., 2001; Kanková et al., 2005), a baixa frequência do polimorfismo 63 pb del (<1%) levou os autores a excluir os indivíduos com esta deleção das análises. Entretanto, estudos na população brasileira (Santos et al., 2005; Torres, 2007) sugerem que o polimorfismo 63 pb del ocorre mais frequentemente, principalmente em Afro-Brasileiros (3,8%), o que torna a sua exclusão das análises um equívoco, visto que a ausência de um alelo da posição -374 T>A pode alterar a expressão do gene *RAGE*. Por isso, a posição -374 da região promotora do gene *RAGE* foi considerada como um polimorfismo com três alelos: T, A e D (alelo da deleção) neste estudo.

Inicialmente foi realizada uma comparação entre CTRL1 e CTRL2 para avaliar a possibilidade de usar o grupo CTRL TOTAL nas comparações com o grupo PFE (Tabela 17). Nesta foi determinado que CTRL1-EB e CTRL2-EB possuem frequências alélicas diferentes do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del ( $P=0,04$ ), enquanto CTRL1-AB e CTRL2-AB se mostraram similares ( $P=0,94$ ). A fim de evitar associações espúrias ao pênfigo foliáceo endêmico e de garantir o pareamento dos fatores ambientais pela importância destes no desencadeamento da doença, prosseguiu-se às análises de associação entre PFE-EB e CTRL1-EB, e PFE-AB e CTRL2-AB (Tabela 18). Por sua vez, nestas análises não foi encontrada associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 63 pb del ( $P\geq 0,06$ ). Finalmente, a comparação entre pacientes e controles da amostra pareada etnicamente (Tabela 19) foi realizada, não sendo observada associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 63 pb del foi corroborada ( $P\geq 0,38$ ).

A diferença encontrada das frequências alélicas do polimorfismo -374 T>A + 63 pb del entre CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 16) e, entre PFE-EB e PFE-AB (item 5.2.3), apontam para uma inconsistência na classificação étnica dos indivíduos

sugerindo que o grupo Euro-Brasileiros da Região Centro-Oeste é menos homogêneo etnicamente quando comparado ao da Região Sul.

Entretanto, deve-se ressaltar que estas diferenças significativas encontradas para o polimorfismo -374 T>A + 63 pb del, desapareceram quando os indivíduos com a deleção foram excluídos das análises (item 5.2.3), sugerindo que o polimorfismo 63 pb del, e não o -374 T>A, está afetando os resultados.

As genotipagens do polimorfismo -374 T>A através do ensaio PCR em Tempo Real, sistema TaqMan<sup>®</sup>, foi confirmada através de clivagem com a enzima Tsp509I por PCR-RFLP (Anexo IV), de 3 amostras de cada genótipo (TT, TA e AA).

#### 6.2.4 Análise de associação individual do polimorfismo 2741 G>A do intron 9 do gene *RAGE*

Estudos de associação a doenças descrevendo polimorfismos em introns do gene *RAGE* ainda são escassos na literatura. A transição 2184 A>G no intron 8 foi associada ao estado antioxidante em pacientes diabéticos (Kanková et al., 2001). Em um estudo posterior, Kanková et al. (2005) encontraram uma maior frequência do alelo 2184G em um grupo de diabéticos com nefropatia.

Seqüências intrônicas podem participar da ativação ou inibição do processo de *splicing* (Venables, 2007). Uma isoforma do receptor *RAGE*, s*RAGE*, é resultado da conservação de parte do intron 9 que introduz um códon de parada na proteína, eliminando as regiões codificadas pelos exons 10 e 11, a hélice transmembrana e a cauda citosólica, respectivamente (Schmidt et al., 1994; Yonekura et al., 2003; Ding e Keller, 2005). A forma s*RAGE* é uma provável supressora da ativação e sinalização de *RAGE*, visto que seqüestra seus ligantes, o que torna interessante a análise de polimorfismos potencialmente relacionados ao *splicing* alternativo de *RAGE*.

Uma busca feita através do programa SNPBrowser<sup>™</sup> v3.5.3 (Applied Biosystems), revelou que o SNP 2741 G>A localizado no intron 9 próximo ao exon 10 poderia estar associado à geração da isoforma protetora s*RAGE* através de *splicing* alternativo, visto que se encontra em uma região de interação com proteínas reguladoras do espliceossomo, tornando-se um alvo interessante de análises de associação a doenças. As frequências alélicas do polimorfismo 2741 G>A

reportadas até o momento são: 100,0% 2741G em europeus; 2,0% 2741A em asiáticos e em africanos (www.hapmap.org).

Neste estudo, para avaliar a pertinência do uso do grupo CTRL TOTAL nas comparações com o grupo PFE, inicialmente também foi realizada uma análise entre CTRL1 e CTRL2 (Tabela 20), na qual foi verificado que CTRL1-EB e CTRL2-EB possuem frequências genóticas, alélicas ( $P=0,02$ ) e de portadores ( $P=0,04$ ) do SNP 2741 G>A diferentes, entretanto, CTRL1-AB e CTRL2-AB se mostraram similares ( $P=1,0$ ). Com a intenção de evitar associações espúrias ao pênfigo foliáceo endêmico, prosseguiu-se às análises de associação entre PFE-EB e CTRL1-EB, e PFE-AB e CTRL2-AB (Tabela 21). Nestas análises não foi encontrada associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 2741 G>A ( $P\geq 0,08$ ). Finalmente, uma comparação entre pacientes e controles da amostra pareada etnicamente (Tabela 22) foi realizada e neste caso também foi encontrada uma ausência de associação entre o pênfigo foliáceo endêmico e o polimorfismo 2741 G>A ( $P\geq 0,60$ ).

Da mesma forma que a observada para os polimorfismos 63 pb del e -374 T>A + 63 pb del, a diferença encontrada das frequências genóticas, alélicas e de portadores do polimorfismo 2741 G>A entre CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 20) e, entre PFE-EB e PFE-AB (item 5.2.4), apontam para inconsistências na classificação étnica dos indivíduos revelando que o grupo Euro-Brasileiros é menos homogêneo etnicamente na Região Centro-Oeste quando comparado ao da Região Sul. Estes resultados sugerem também que possivelmente 2741 G>A está associado a etnias.

Finalmente, a genotipagem do SNP 2741 G>A através da reação PCR em Tempo Real com o sistema TaqMan<sup>®</sup> foi confirmada pelo seqüenciamento após clonagem do produto de PCR do intron 9 (item 5.2.4).

### 6.3 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS -429 T>C, -374 T>A + 63 PB DEL E 2741 G>A DO GENE *RAGE*

Estudos de haplótipos de polimorfismos do gene *RAGE* ainda são escassos na literatura. Kanková et al. (2005) encontraram uma associação entre um haplótipo incluindo os alelos -429C e -374T e nefropatia em caucasóides com diabetes tipo 2.



Em um estudo populacional usando uma amostra incluindo Euro- e Afro-Brasileiros, Torres (2007) não detectou associação entre as etnias e os haplótipos dos polimorfismos -429 T>C e -374 T>A, os quais estão em desequilíbrio de ligação absoluto, resultados concordantes com os achados por Hudson et al. (2001).

Neste estudo, inicialmente foram comparadas as freqüências haplotípicas entre os subgrupos CTRL1 e CTRL2 (Tabela 23), para avaliar a possibilidade de uso do grupo CTRL TOTAL, como foi feito para a análise individual de cada polimorfismo (item 4.2). Foi observada uma diferença significativa ( $P=0,03$ ) das freqüências haplotípicas entre CTRL1-EB e CTRL2-EB (Tabela 23), portanto, as comparações foram realizadas entre PFE-EB e o subgrupo CTRL1-EB, e entre PFE-AB e CTRL TOTAL-AB, para evitar associações espúrias (Tabela 24). Neste caso, não foi detectada associação entre os haplótipos e o pênfigo foliáceo endêmico ( $P\geq 0,37$ ), resultados confirmados pelos resultados da análise da amostra pareada etnicamente (Tabela 25), PFE<sub>p</sub> e CTRL TOTAL<sub>p</sub> ( $P=0,23$ ).

As análises do desequilíbrio de ligação (Tabelas 26, 27 e 28) foram realizadas com uma amostra total pareada etnicamente, que inclui indivíduos dos grupos PFE<sub>p</sub> e CTRL TOTAL<sub>p</sub>. Depois da realização de outras análises com a amostra, somando ou não os grupos Euro- e Afro-Brasileiros em uma amostra total, esta escolha foi adotada visando aumentar o número da amostra, visto que em todos os casos obteve-se o mesmo padrão do coeficiente  $D'$ .

Os resultados obtidos revelaram associação *cis*, ou seja, a ocorrência desses alelos juntos mais do que o esperado, entre os alelos -429C e -374T, -429T e -374A ou -374D (63 pb del), 2741G e -374T ou -374A, e 2741A e -374D (63 pb del). Um forte desequilíbrio de ligação ( $D'\approx 1,0$ ;  $P<0,0001$ ;  $r^2=0,95$ ) foi encontrado entre os alelos 63 del e 2741A, e o alto coeficiente de correlação ( $r^2>0,8$ ) sugere que um destes alelos pode ser utilizado isoladamente para identificar o haplótipo em estudos de associação a doenças, visto que a variabilidade de cada alelo individualmente é capaz de representar a variabilidade possível no outro locus. Nestas condições, o poder de detectar associação a doenças com um locus marcador ao usar uma amostra de tamanho  $N$  é aproximadamente igual ao poder de detectar a associação com o locus causal usando uma amostra de tamanho  $Nr^2$  (VanLiere e Rosenberg, 2008). Deve-se ressaltar que os polimorfismos 2741G>A e 63 pb del estão

presentes em baixa frequência na população em estudo o que pode afetar as análises estatísticas envolvendo estas variações.

#### 6.4 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -429 T>C DO GENE *RAGE* E VARIANTES DOS GENES HLA-DRB1 E HLA-DQB1

Alelos de genes HLA têm sido estudados extensivamente buscando associações com diversas doenças imunológicas, incluindo o pênfigo (Petzl-Erler e SantaMaria, 1989; Moraes et al., 1991; Cerna et al., 1993; Miyagawa et al., 1999; Moiseu et al., 2000; Pavoni et al., 2003). Estudos também evidenciaram que alelos HLA são marcadores de ancestralidade (Probst et al., 2000). Petzl-Erler e SantaMaria (1989) sugerem que genes do MHC de classe II controlam a predisposição ao pênfigo foliáceo endêmico. Neste estudo foi constatada associação positiva da doença com HLA-DR1, DR4 e DR16, e associação negativa com DR7. Estes resultados foram recentemente confirmados, num estudo que objetivou avaliar as associações entre PFE e alelos HLA-DRB1 (Pavoni et al., 2003).

Hudson et al. (1998) aventaram que devido à proximidade entre o gene *RAGE* e a região HLA é possível que qualquer associação encontrada entre *RAGE* e complicações do diabetes seja devida a um desequilíbrio de ligação com variações nos loci de HLA. Entretanto, apesar de existir uma associação entre diabetes e polimorfismos dos genes HLA, ainda não há evidências que suportem esta associação com o desenvolvimento de complicações do diabetes (Hudson et al., 1998).

Um haplótipo do MHC típico de Caucasoídes, o haplótipo ancestral 8.1 (8.1 AH), está associado a doenças imunológicas, entretanto, os efeitos diretos de seus genes integrantes ainda não foram determinados (Price et al., 1999). O haplótipo 8.1 AH foi associado ao desenvolvimento acelerado do HIV (Cameron et al., 1990), susceptibilidade ao diabetes tipo 1 (Hanifi et al., 1998), lúpus eritematoso sistêmico (Christiansen et al., 1991), dermatite herpétiforme (Wilson et al., 1995) e miastenia grave (Degli-Esposti et al., 1992). O alelo -429C pertence ao haplótipo ancestral 8.1

(8.1 AH) de Caucasoídes (Price et al., 1999; Laki et al., 2007) que inclui, entre outros, os alelos \*0301 do gene HLA-DRB1 e \*0201 de HLA-DQB1.

Esses dados juntamente com a associação negativa encontrada entre a frequência do alelo -429C e o pênfigo foliáceo endêmico em Euro-Brasileiros neste estudo indicam que a análise de haplótipos dessas três posições é relevante. Pesquisadores do grupo LGMH, em estudos anteriores, já genotiparam os genes HLA-DRB1 e DQB1 em grande parte da amostra em estudo e cederam gentilmente esses dados para análise de haplótipos com o SNP -429 T>C da região promotora do gene *RAGE*.

Uma vez que os genes HLA são freqüentemente associados a etnias (Probst et al., 2000), as análises foram realizadas entre o grupo PFE-EB e o subgrupo CTRL1-EB, minimizando associações espúrias com o pênfigo foliáceo endêmico. Além disso, esta escolha se deve ao maior tamanho da amostra de Euro-Brasileiros em relação a Afro-Brasileiros, e porque os dados reportados na literatura (Price et al., 1999) sugerem que o haplótipo 8.1 AH é típico de Caucasoídes.

Na amostra estudada os haplótipos -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*04.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 estão associados à susceptibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico (Tabela 29). Por outro lado, os haplótipos -429T.DRB1\*07.DQB1\*02, -429T.DRB1\*11.DQB1\*03, -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 conferem proteção ao desenvolvimento da doença (Tabela 29). Os resultados obtidos para as análises de associação entre haplótipos e o pênfigo foliáceo endêmico são coincidentes com os descritos em outros estudos. Petzl-Erler e SantaMaria (1989) sugerem que DR1.DQw1 e DR4.DQw3 são marcadores de susceptibilidade, e DR7.DQw2 e DR3.DQw2 são marcadores de resistência ao pênfigo foliáceo endêmico. Pavoni et al. (2003) encontraram que os alelos HLA-DRB1\*01, \*04, \*14 e \*16 conferem susceptibilidade, e HLA-DRB1\*03, \*08 e \*11 são responsáveis por conferir resistência ao pênfigo foliáceo endêmico. Outros estudos também associam PFE aos alelos HLA DRB1\*01 (Moraes et al., 1991), \*04 e \*14 e (Moraes et al., 1991; Cerna et al., 1993). Em populações indígenas (Terena e Xavantes) somente DRB1\*04 foi associado com PF, e DRB1\*08 se mostrou associado negativamente. Estudos com PF esporádico revelaram associações com os alelos DRB1\*01 e \*04 em europeus (Moiseu et al., 2000), e com \*04 e \*14 em asiáticos (Miyagawa et al., 1999). Em uma amostra de pacientes

de pênfigo vulgar e foliáceo da Turquia, foi encontrada uma associação positiva com DR14, DQ8 e DQ4, e negativa com DR11, DQ7 e DQ2 (Birol et al., 2002). É preciso considerar que as associações entre os haplótipos -429T.DRB1\*11.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 encontradas particularmente neste estudo podem também refletir uma associação primária entre o pênfigo foliáceo endêmico e alelos do gene HLA-DQB1, menos estudados até o momento.

Na amostra estudada, o haplótipo -429C.DRB1\*03.DQB1\*02 (8.1 AH) não está associado à doença (Tabela 29), no entanto, uma tendência à associação negativa ao pênfigo foliáceo endêmico é observada pelos valores  $P=0,12$ ,  $OR=0,27$  [0,06-1,27]. Petzl-Erler e SantaMaria (1989) sugerem que o haplótipo formado pelos alelos HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02 são marcadores de resistência ao pênfigo foliáceo endêmico em Euro-Brasileiros. É importante lembrar que apesar do uso do grupo CTRL1-EB para as análises haplotípicas pelos motivos citados acima, as análises que detectaram a fraca associação entre as freqüências alélicas do polimorfismo -429 T>C e o pênfigo foliáceo endêmico foram realizadas entre PFE-EB e CTRL TOTAL-EB (Tabela 15), visto que os grupos CTRL1-EB e CTRL2-EB se mostraram com freqüências genotípicas, alélicas e de portadores, estatisticamente similares (Tabela 14). Dessa forma, é interessante notar que comparando PFE-EB e CTRL TOTAL-EB, a tendência de o haplótipo 8.1 AH estar associado negativamente ao pênfigo foliáceo endêmico se torna ainda mais próxima do limiar de significância:  $P=0,06$ ,  $OR=0,25$  [0,06-1,06] (item 5.4). Seguramente, a análise de uma amostra maior é essencial para determinar a associação entre o haplótipo 8.1 AH e o pênfigo foliáceo endêmico, devido à baixa freqüência do mesmo na população estudada (haplótipo 8.1 AH: <3%) fator complicador na determinação de associação a doenças.

Além do próprio haplótipo 8.1 AH (-429C.DRB1\*03.DQB1\*02), dentre os haplótipos encontrados nas análises haplotípicas dos polimorfismos -429 T>C e alelos dos genes HLA-DRB1 e DQB1, alguns já foram descritos em estudos anteriores (Laki et al., 2007) -429C.DRB1\*13.DQB1\*02, -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*03.DQB1\*02, -429T.DRB1\*13.DQB1\*06, -429T.DRB1\*15.DQB1\*06 e -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 (Tabela 29).

Além disso, os resultados obtidos para o desequilíbrio de ligação (Tabelas 30 e 31) sugerem de fato uma forte associação *cis* entre os alelos do haplótipo 8.1 AH

-429C, HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02. Em relação aos outros alelos, não houve um padrão do desequilíbrio de ligação nos grupos PFE-EB e CTRL1-EB, e por essa razão a análise foi realizada com os grupos separadamente. Associação *cis* foi também encontrada entre os alelos HLA-DRB1\*07 e -429C ( $P \leq 0,02$ ) em ambos os grupos (PFE-EB e CTRL1-EB). No grupo PFE-EB (Tabela 30), os alelos HLA-DRB1\*01 e -429T, e -429C e HLA-DRB1\*08, ocorreram juntos em maior frequência do que o esperado ( $P \leq 0,01$ ). No subgrupo CTRL1 (Tabela 31) foi encontrada uma associação *cis* entre os alelos -429T e HLA-DRB1\*04 e, -429T e DQB1\*06 ( $P \leq 0,04$ ). Entretanto, os baixos valores encontrados para o coeficiente de correlação ( $r^2 < 0,1$ ), sugerem que nenhum destes alelos pode ser utilizado isoladamente para identificar todo o haplótipo do qual faz parte em estudos de associação, visto que a variabilidade de cada alelo individualmente não é capaz de representar a variabilidade possível nos outros loci.

## 6.5 DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES

Os sítios polimórficos mais estudados do gene *RAGE* são o exon 3 e a região promotora (Hudson et al., 1998; Hudson et al., 2001). No exon 3, o polimorfismo que promove a substituição de uma glicina por serina no codon 82 (G82S), resulta em uma proteína com maior afinidade pelos ligantes (Hudson et al., 2002). O alelo 82S tem elevada prevalência em orientais (cerca de 20%), sendo menos freqüente (<10%) em populações ocidentais (Hudson et al., 1998; Liu e Xianc, 1999). Na população brasileira, a freqüência do alelo 82S é de cerca de 3% (Naka et al., 2006; Torres, 2007) e não está associado ao diabetes e à doença arterial coronariana (Picheth, 2007).

As variações genéticas da região promotora de *RAGE* têm revelado associação dos polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e 63 pb del (-407\_-345del) com complicações do diabetes tipos 1 e 2, bem como com a severidade da doença cardiovascular (Petterson-Fernholm 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, uma vez que os alelos raros -429C, -374A e 63del condicionam aumento na expressão do gene *RAGE* (Hudson et al., 2001).

Poucos estudos têm se dedicado a detectar novas variações genéticas na região promotora de *RAGE*. Heidemann (2008) caracterizou a mutação -505\_-504delTT através de seqüenciamento do produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* seguindo resultados iniciais de triagem utilizando a técnica de PCR-SSCP que sugeriram a presença de novas mutações nesta região de *RAGE* (Picheth, 2007).

Neste estudo, o perfil eletroforético do produto de PCR da região promotora (344 pb) do gene *RAGE* de quatro amostras (52, 476, 646 e 688) foi diferente do usual em gel de poliacrilamida 8% (20:1) (Figura 21). Este padrão diferenciado poderia indicar a existência de uma variação genética nova. Estas foram então caracterizadas por meio de PCR-SSCP (item 4.4.1).

Os produtos de PCR das amostras 52 e 688 apresentaram padrão eletroforético no ensaio de PCR-SSCP (Figura 22) idêntico entre si em gel de poliacrilamida 8% (29:1), sugerindo similaridade entre as seqüências. Por outro lado, o produto de PCR das amostras 476 e 646 exibiram um padrão diferenciado das amostras 52 e 688 (Figura 22), mas similar entre si, sugerindo também similaridade entre as seqüências. Para determinar a presença ou ausência de mutações potencialmente novas e caracterizá-las foi realizado o seqüenciamento desta região destas amostras (4.4.4).

Como o DNA humano é diplóide, no seqüenciamento, 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 freqüência de uma análise individual, base a base, de cada amostra em estudo. Além disso, amostras com deleção em heterozigose apresentam sobreposição de bases a partir dos nucleotídeos deletados, o que torna a análise de seqüenciamento nessas condições inconclusiva. Programas computacionais que realizam análises de modo automático dependem da qualidade da seqüência e podem apresentar resultados espúrios associados a problemas metodológicos da reação de seqüenciamento (Kwok, 2003). Para solucionar esses problemas, o produto de PCR das amostras heterozigotas foram primeiramente clonados e os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados (itens 4.4.2, 4.4.3 e 4.4.4).

A clonagem e o seqüenciamento também foram utilizados para confirmação da genotipagem do polimorfismo 2741 G>A pela técnica de PCR em Tempo Real (4.3.3), porque o fabricante (Applied Biosystems) não disponibiliza as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região do SNP 2741 G>A do intron 9, e estes são fornecidos em uma mistura de reação contendo também as sondas alelo-específicas marcadas com fluoróforos. Este ensaio permitiu a confirmação dos resultados obtidos com a PCR em Tempo Real.

Por sua vez, o seqüenciamento da região promotora do gene *RAGE* revelou que duas amostras do subgrupo CTRL2-EB (476 e 646) apresentam uma variante genética ainda não descrita na literatura, a mutação -510\_-509delCT em heterozigose (Figura 23). As amostras 476 e 646 apresentaram seqüências idênticas do produto de PCR (344 pb) da região promotora do gene *RAGE*, inclusive com os mesmos haplótipos dos polimorfismos presentes: (1) -510\_-509insCT.-429C.-374T e (2) -510\_-509delCT.-429T.-374A. O produto de PCR da região promotora do gene *RAGE* da amostra 52 não apresentou nenhuma nova variação em sua seqüência indicando que algum outro fator causou a alteração do seu perfil eletroforético como, por exemplo, uma variação da concentração iônica da amostra.

A região promotora do gene *RAGE* de dois indivíduos pertencentes a uma amostra de diabéticos tipo 1 estudada por Picheth (2007) foi seqüenciada e ambas também apresentaram a deleção -510\_-509delCT (Figura 23). A mutação -505\_-504delTT descrita por Heidemann (2008) em um paciente com diabetes tipo 2 e doença arterial coronariana, está localizada à próxima da deleção -510\_-509delCT.

A deleção -510\_-509delCT está localizada na região promotora do gene *RAGE*, na qual já foram descritos pelo menos três polimorfismos funcionais que alteram a expressão do gene: -429 T>C, -374 >A e 63 bp del. Li e Schmidt (1997), num estudo de caracterização e análise funcional da região promotora de *RAGE*, determinaram sítios de potencial interação com fatores de transcrição, incluindo NF- $\kappa$ B. A deleção -510\_-509delCT está próxima de dois desses prováveis sítios de interação com NF- $\kappa$ B, principalmente do que inicia no nucleotídeo -467. Essa proximidade poderia afetar a afinidade entre DNA e proteínas reguladoras, alterando os níveis de transcrição do gene.

É importante lembrar que a deleção -510\_-509delCT é muito pequena, podendo ser detectada somente em eletroforese em géis de alta resolução, PCR-SSCP ou seqüenciamento de DNA. Assim é possível que a freqüência deste polimorfismo seja maior do que a inferida por estas duas ocorrências em uma amostra de 763 indivíduos genotipados (0,26%), já que fatores tais como flutuações na concentração iônica, tipo de íons, presença de outros contaminantes nas amostras, etc., podem mascarar a diferença de migração eletroforética. Estudos funcionais deste polimorfismo poderão fornecer maiores informações quanto aos seus efeitos.

O produto de PCR do exon 3 do gene *RAGE* de indivíduos da amostra de diabéticos tipo 1 estudada por Picheth (2007) também foi clonado e seqüenciado. Estas amostras também apresentaram padrão diferente dos usuais na reação de PCR-SSCP. A seqüência de DNA obtida revelou uma transição de citosina para timina (CGT→TGT) na posição 540 (Figura 24) responsável por uma substituição não-sinônima do resíduo de arginina (polar básico) para cisteína (polar neutro) na posição 77 do receptor RAGE (R77C) (Figura 25). Esta variante genética já havia sido descrita por Kanková et al. (2001) em um indivíduo de um total de 45 (2,2%) em estudo de mutações incluindo a região do gene *RAGE* entre os nucleotídeos -4 e 3334 numa população de caucasóides. Segundo Kanková et al. (2001), este polimorfismo gera a perda de um sítio de restrição da enzima BssSI, o que permite a diferenciação dos genótipos através da técnica de PCR-RFLP.

É importante ressaltar que a baixa freqüência destas variantes genéticas na amostra estudada sugere que seu efeito esperado em processos patológicos na população seja muito pequeno mesmo que exista modificação funcional da proteína.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo apontam para uma possível função protetora do alelo -429C da região promotora para o desenvolvimento do pênfigo foliáceo endêmico. Estudos usando uma amostra maior podem confirmar essa associação e definir claramente a função do gene *RAGE* no processo patológico.



## 7. CONCLUSÕES

- As características epidemiológicas do pênfigo foliáceo endêmico nas amostras estudadas são: proporção mulheres:homens próxima de 1:1, aparecimento das lesões primárias características da doença em indivíduos mais jovens, além de ocorrência comum em indivíduos consangüíneos;
- Os polimorfismos 63 pb del, -374 T>A e 2741 G>A não estão associados ( $P>0,05$ ) ao pênfigo foliáceo endêmico;
- Foi encontrada uma associação significativa ( $P=0,04$ ) entre o alelo -429C e pênfigo foliáceo endêmico;
- A frequência do polimorfismo 2741 G>A foi pela primeira vez descrita em uma população brasileira, sendo a frequência do alelo 2741A cerca de 4,0%;
- Os haplótipos formados pelos polimorfismos de *RAGE*, -429 T>C, -374 T>A + 63 pb del e 2741 G>A não estão associados ao pênfigo foliáceo endêmico;
- Os alelos D (63 pb del) e 2741A encontram-se em forte desequilíbrio de ligação ( $D' \approx 1,0$ ;  $P<0,0001$ ;  $r^2=0,95$ ) na amostra total pareada etnicamente, podendo ser escolhidos para identificar haplótipos (que incluem esses dois polimorfismos) em estudos de associação;
- Os haplótipos -429T.DRB1\*01.DQB1\*05, -429T.DRB1\*04.DQB1\*03 e -429T.DRB1\*16.DQB1\*05 conferem susceptibilidade ao pênfigo foliáceo endêmico em Euro-Brasileiros na amostra estudada;
- Os haplótipos -429T.DRB1\*07.DQB1\*02, -429T.DRB1\*11.DQB1\*03, -429T.DRB1\*13.DQB1\*06 conferem resistência ao pênfigo foliáceo endêmico em Euro-Brasileiros na amostra estudada;
- O haplótipo ancestral 8.1 (-429C.DRB1\*03.DQB1\*02) não está associado ao pênfigo foliáceo endêmico em Euro-Brasileiros na amostra estudada ( $P=0,12$ ,  $OR=0,27$  [0,06-1,27]);
- Em Euro-Brasileiros na amostra estudada foi encontrada associação *cis* significativa ( $P<0,05$ ) entre os alelos: -429C, HLA-DRB1\*03 e DQB1\*02, pertencentes ao haplótipo ancestral 8.1 AH;
- Na região promotora do gene *RAGE* foi encontrada uma mutação ainda não descrita na literatura, -510\_-509delCT, com frequência estimada de 0,26% na amostra em estudo.

## REFERÊNCIAS

ABOUBAKER J.; MORAR N.; RAMDIAL P.K. Pemphigus in South Africa. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 115–119, 2001.

AHMED, M. U.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 4889–4894, 1986.

AMAGAI, M. Keratinocyte-keratinocyte interactions, cadherins and pemphigus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, p. 146-152, 1995.

ANDRASSY, M.; IGWE, J.; AUTSCHBACH, F.; VOLZ, C.; REMPPIS, A.; NEURATH, M. F.; SCHLEICHER, F.; HUMPERT, P. M.; WENDT, T.; LILIENSIEK, B.; MORCOS, M.; SCHIEKOFER, S.; THIELE, K.; CHEN, J.; KIENTSCH-ENGEL, R.; SCHMIDT, A. M.; STREMMEL, W.; STERN, D. M.; KATUS, H. A.; NAWROTH, P. P.; BIERHAUS, A. Posttranslationally Modified Proteins as Mediators of Sustained Intestinal Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 169, p. 1223-1237, 2006.

BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; CATERINA, R. D. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular Research**. v. 63, p. 582-592, 2004.

BASTUJI-GARIN, S.; SOUISSI, R.; BLUM, L.; TURKI, H.; NOUIRA, R.; JOMAA, B.; ZAHAF, A.; BEN OSMAN, A.; MOKHTAR, I.; FAZAA, B. Comparative epidemiology of pemphigus in Tunisia and France: unusual incidence of pemphigus foliaceus in young Tunisian women. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 104, p. 302-305, 1995.

BECKER, K. G.; SIMON, R. M.; BAILEY-WILSON, J. E.; FREIDLIN, B.; BIDDISON, W. E.; MCFARLAND, H. F.; TRENT, J. M. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95; p. 9979-9984, 1998.

BIERHAUS, A.; HASLBECK, K. M.; HUMPERT, P. M.; LILIENSIEK, B.; DEHMER, T.; MORCOS, M.; SAYED, A. A. R.; ANDRASSY, M.; SCHIEKOFER, S.; SCHNEIDER, J. G.; SCHULZ, J. B.; HEUSS, D.; NEUNDÖRFER, D.; DIERL, S.; HUBER, J.; TRITSCHLER, H.; SCHMIDT, A. M.; SCHWANINGER, M.; HAERING, H. U.; SCHLEICHER, E.; KASPER, M.; STERN, D. M.; ARNOLD, B.; NAWROTH, P. P. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1741-1751, 2004.

BIROL, A.; ANADOLU, Y.; TUTKAK, H.; GÜRGEY, E. HLA-class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. **The International Society of Dermatology**, v. 41, p. 79-83, 2002.

BHOL, K.; MOHIMEN, A.; AHMED, A. R. Correlation of subclasses of IgG with disease activity in pemphigus vulgaris. **Dermatology**, v. 1, p. 85-89, 1994.

BLAUSTEIN, M.; PELISCH, F.; SREBROW, A. Signals, pathways and splicing regulation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 2031–2048, 2007.

BRAU-PRADO, K.; PETZL-ERLER, M. L. Programmed cell death 1 gene (PDCD1) polymorphism and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 314-321, 2007.

BROWNLEE, M. Advanced Protein Glycosilation in Diabetes and Aging. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 223-234, 1995.

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

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

CAMERON, P. U.; MALKL, S. A.; FRENCH, M. A. H.; DAWKINS, R. L. Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection; ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. **Human Immunology**, v. 29, p. 282-295, 1990.

CAMPBELL, R.; AIOK, V.; CUNHA, P.; HANS-FILHO, G.; ALVES, G.; ROCHA, R.; FRIEDMAN, H. Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 76, p. 13-33, 2001.

CERNA, M.; FERNANDEZ-VINA, M.; FRIEDMAN, H. Genetic markers for susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (Fogo Selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens**, v. 42, p. 138-140, 1993.

CHAMS-DAVATCHI, C.; VALIKHANI, M.; DANESHPAZHOOH, M.; ESMAILI, N.; BALIGHI, K.; HALLAJI, Z.; BARZEGARI, M.; AKHIANI, M.; GHODSI, Z.; MORTAZAVI, H.; NARAGHI, Z. Pemphigus: Analysis of 1209 cases. **International Journal of Dermatology**, v. 44, p. 470 –476, 2005.

CHAVAKIS, T.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1219–1225, 2004.

CHIDGEY, M. Desmosomes and disease. **Histology and Histopathology**, v. 12, p. 1159-1168, 1997.

CHRISTIANSEN, F. T.; ZHANG, W. J.; GRIFFITHS, M.; MALLAL, S. A.; DAWKINS, R. L. Major histocompatibility complex (MHC) complement deficiency, ancestral haplotypes and systemic lupus erythematosus (SLE); C4 deficiency explains some but not all of the influence of the MHC. **Journal of Rheumatology**, v. 18; p. 1350-1355, 1991.

COLLINS, T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. **Laboratory Investigation**, v. 68, p. 499–508, 1993.

DASHER, D.; RUBENSTEIN, D.; DIAZ, L. A. Pemphigus foliaceus. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 10, p. 1–13, 2008.

DEGH-ESPOSTI, M. A.; ANDREAS, A.; CHRISTIANSEN, F. T.; SCLIALKE, B.; ALBERT, E.; DAWKINS, R. L. An approach to the localization of the susceptibility genes for generalised myasthenia gravis by mapping recombinant ancestral haplotypes. **Immunogenetics**, v. J5; p. 355-364, 1992.

DIAZ, L. A.; ARTEAGA, L. A.; HILARIO-VARGAS, J.; VALENZUELA, J. G.; LI, N.; WARREN, S.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; EATON, D.; SANTOS, V.; NUTMAN, T. B.; MAYOLO, A. A.; QAQISH, B. F.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Anti-Desmoglein-1 Antibodies in Onchocerciasis, Leishmaniasis and Chagas Disease Suggest a Possible Etiological Link to Fogo Selvagem. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p.1045 –1051, 2004.

DIAZ, L. A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; MARTINS, C. R.; CUNHA, P. R.; LOMBARDI, C.; ALMEIDA, F. A.; CASTRO, R. M.; MACCA, M. L.; LAVRADO, C.; HANS-FILHO, G.; BORGES, P.; CHAUL, A.; MINELLI, L.; EMPINOTTI, J. C.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I.; LABIB, R. S.; ANHALT, G. J. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, p. 4-12, 1989.

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

EATON, D. P.; DIAZ, L. A.; HANS-FILHO, G.; SANTOS, V. D.; AOKI, V.; FRIEDMAN, H.; RIVITTI, E. A.; SAMPAIO, A. S.; GOTTLIEB, M. S.; GIUDICE, G. J.; LOPEZ, A.; CUPP, E. W. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an ameridian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The Cooperative Group on Fogo Selvagem Research. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 120-31, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

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

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

FALCONE, C.; CAMPO, I.; EMANUELE, E.; BUZZI, M.P.; ZORZETTO, M.; SBARSI, I.; CUCCIA, M. Relationship between the -374T/A *RAGE* gene polymorphism and angiographic coronary artery disease, **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, p. 1061-1064, 2004.

GEBHARDT, C.; RIEHL, A.; DURCHDEWALD, M.; NÉMETH, J.; FÜRSTENBERGER, G.; MÜLLER-DECKER, K.; ENK, A.; ARNOLD, B.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P.; HESS, J.; ANGEL, P. *RAGE* signaling sustains inflammation and promotes tumor development. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 275-285, 2008.

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. **Klin Monatsbl Augenheilkd (Thieme-connect)**, v. 220, p. 873-876, 2003.

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

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HANIFI MOGHADDAM, P.; DE KNIJF, P.; ROEP, B. O.; VAN DER AUWERA, B.; NAIPAL, A.; GORUS, F.; SCHUIT, F.; GIPHART, M. J. Genetic structure of IDDM1: two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility or protection. **Diabetes**, v. 47, p. 263-269, 1998.

HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E.; et al. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Clinical Dermatology**, v. 17, p. 225-235, 1999.

HARMAN, K. E.; BLACK, M. M.; High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. **British Journal of Dermatology**, v. 140, p. 865-874, 1999.

HapMap Project [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)

HEIDEMANN, M. Identificação de novas variações genéticas da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (*RAGE*). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná, 2008.

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

HUDSON, B. I.; STICKLAND, M. H.; FUTERS, T. S.; GRANT, P. J. Study of the -429 T>C and -374 T>A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease. **Diabetes Care**, v. 24, 2004.

HUDSON, B. I.; HOLFMANN, A. M.; BUCCIARELLI, L.; WENDT, T.; MOSER, B.; LU Y.; QU, W.; STERN, D. M.; D`AGATTI, V.; YAN, S.D.; YAN, S. F.; GRANT, P. J.; SCHIMIDT, A. M. Glycation and diabetes: The RAGE connection. **Current Science**, v. 83, p. 1515-1520, 2002.

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

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

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

ICHIKAWA, K.; YOSHINARI, M.; IWASE, M.; WAKISAKA, M.; DOI, Y.; IINO, K.; YAMAMOTO, M.; FUJISHIMA, M. Advanced glycosylation end products induced tissue factor expression in human monocyte-like U937 cells and increased tissue factor expression in monocytes from diabetic patients. **Atherosclerosis**, v. 136, p. 281–287, 1998.

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.

JONES, C. C.; HAMILTON, R. G.; JORDON, R. E. Subclass distribution of human IgG autoantibodies in pemphigus. **Journal of Clinical Immunology**, v. 8, p. 43-49, 1988.

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

KANKOVÁ, K.; MAROVA. I.; ZAHEJSKY, J.; MUZÍK, J.; STEJSKALOVÁ, A.; ZNOJIL, V.; VÁCHA, J. Polymorphisms 1704G>T and 2184A>G in the *RAGE* gene are associated with antioxidant status. **Metabolism**, v. 50, p. 1152–1160, 2001.

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

KIBERTIS, P.; ROBERTS, L. It's not just the genes. **Science**, v. 296, p. 685, 2002.

KUMARAMANICKAVEL, G.; RAMPRASAD, V. L.; SPRIPRIYA, S.; UPADYAY N. K.; PAUL, P. G.; SHARMA, T. Association of Gly82Ser polymorphism in the *RAGE* gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients. **Journal of Diabetes Complications**, v. 16, p. 391- 394, 2002.

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

LAKI, J.; KISZEL, P.; VATAY, A.; BLASKÓ, B.; KOVÁCS, M.; KORNER, A.; MADÁCSY, L.; BLATNICZKY, L.; ALMÁSSY, Z.; SZALAI, C.; RAJCZY, K.; POZSONYI, É.; KARÁDI, I.; FAZAKAS, Á.; HOSSZÚFALUSI, N.; PÁNCZÉL, P.; ARASON, G. J.; WU, Y. L.; ZHOU, B.; YANG, Y.; YU, C. Y.; FUST, G. The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429 T>C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (*RAGE*) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobin<sub>A1C</sub> levels in diabetic patients. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 648-655, 2007.

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

LJUBOJEVIC, S.; LIPOZENCIC, J.; BRENNER, S.; BUDIMCIĆ, D. Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19-year period. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**; v. 16, p. 599–603, 2002.

LI, N.; AOKI, V.; HANS-FILHO, G.; RIVITTI, E.A.; DIAZ, L.A. The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, p. 1501-10, 2003.

LI, J; SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of *RAGE*, the receptor for advanced glycation end products. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 16498-16506, 1997.

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

LOMBARDI, C.; BORGES, P. C.; CHAUL, A.; SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A.; FREIDMAN, H.; MARTINS, C. R.; SANCHES, J. A.; CUNHA, P. R.; HOFFMANN, R. G.; DIAZ, L. A. The cooperative group on fogo selvagem reaserch. Enviromental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **Journal of Investigative Dermatology**, v. 98, p. 847-850, 1992.

MALHEIROS D. Pênfigo foliáceo endêmico e polimorfismo genético da desmogleína 1: existe alguma relação? Curitiba, 2003. **Monografia de conclusão de curso**. Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal o Paraná.

MARTEL, P.; LOISEAUB, P.; JOLYA, P.; BUSSONC, M.; LEPAGEB, V.; MOUQUETA, H.; COURVILLEA, P.; FLAGEULD, B.; CHARRONB, D.; MUSETTEA, P.; GILBERTA, D.; TRON, F. Paraneoplastic pemphigus is associated with the DRB1\*03 allele. **Journal of Autoimmunity**, v. 20, p. 91–95, 2003.

MATSUNAGA-IRIE, S.; MARUYAMA, T.; YAMAMOTO, Y.; MOTOHASHI, Y.; HIROSE, H.; SHIMADA, A.; MURATA, M.; SARUTA, T. Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 27, p. 303–307, 2004.

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

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

MIYGAWA, S.; AMAGAI, M.; NIIZEKI, H.; YAMASHINA, Y.; KANESHIGE, T.; NISHIKAWA, T.; SHIRAI, T.; INOKO H. HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. **Tissue Antigens**, v. 54, p. 333-340, 1999.

MOISEAU, P.; LECLEACH, L.; PROST, C.; LEPAGE, V.; BUSSON, M.; BASTUJIGARIN, S.; ROUJEAU, J. C.; CHARRON, D. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. **Journal of Autoimmune Diseases**, v. 15, p. 67-73, 2000.

MORAES, J. R.; MORAES, M. E.; FERNANDEZ-VINA, M.; DIAZ, L. A.; FRIEDMAN, H.; CAMPBELL, I. T.; ALVAREZ, R. R.; SAMPAIO, S. A.; RIVITTI, E. A.; STASTNY, P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics**, v. 33, p. 381-391, 1991.

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

NALDI, L.; BERTONI, M.; CAINELLI, T. Feasibility of a registry of pemphigus in Italy: two years experience. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia (GISED). **International Journal of Dermatology**; v. 32, p. 424–427, 1993.

NAGARAJ, R. H.; SHIPANOVA, I. N.; FAUST, F. M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 19338 – 19345, 1996.

NEEPER, M.; SCHMIDT, A. M.; BRETT, J.; YAN, S. D.; WANG, F.; PAN, Y. C.; ELLISTON, K.; STERN, D.; SHAW, A. Cloning and expression of a cell surface



receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **Journal Biological Chemistry**, v. 267, p. 14998–15004, 1992.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; BROWNLEE, M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. **Kidney International**, v. 58, 526-530, 2000.

O'BRIEN KD, ALLEN MD, MCDONALD TO, CHAIT A, HARLAN JM, FISHBEIN D, MCCARTY J, FERGUSON M, HUDKINS K, BENJAMIN CD, ET AL. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigative**, v. 92, p. 945–951, 1993.

PAVONI, D. P.; ROXO, V. M. M. S.; MARQUAT FILHO, A.; PETZL-ERLER, M. L. Dissecting the associations of endemic Pemphigus Foliaceus (Fogo Selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. **Genes and Immunity**, v. 4, p. 110-116, 2003.

PEREIRA, N. F.; HANSEN, A. J.; LIN, M. T.; ROXO, V. M. M. S.; BRAUN, K.; PETZEL-ERLER, M. Cytokine gene polymorphisms in endemic pemphigus foliaceus: a possible role for *IL6* variants. **Cytokine**; v. 28, p. 233-241, 2004.

PETRONIS, A. Human morbid genetics revisited: relevance of epigenetics. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 142-146, 2001.

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

PETZL-ERLER M. L.; SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens**; v. 33, p. 408-414, 1989.

PETZL-ERLER, M. L. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 51, p. 199-211, 1999.

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, C. O.; PEDROSA, F. O.; 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. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, p. 1268-1272, 2007a.

PICHETH, G.; HEIDEMANN, M.; PEDROSA, F. O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; COSTANTINI, C. O.; MARTINEZ, T. L. R.; SOUZA, E. M. The -429 T>C Polymorphism of the Receptor for Advanced Glycation End Products (*RAGE*) is

Associated with Type 1 Diabetes in a Brazilian Population. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, p. 163-164, 2007b.

POIRIER, O.; NICAUD, V.; VIONNET, N.; RAOUX, S.; TARNOW, L.; VLASSARA, H.; PARVING, H. H.; CAMBIEN, F. 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.

PRICE, P.; WITT, C.; ALLCOCK, R.; SAYER, D.; GARLEPP, M.; CHOY KOK, C.; FRENCH, M.; MALLAL, S.; CHRISTIANSEN, F. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. **Immunological Reviews**, v. 167, p. 257-274, 1999.

PROBST, C. M. ; BOMPEIXE, E. P. ; PEREIRA, N. F. ; DALALIO, M. M. O. ; VISENTAINER, J. E. ; TSUNETO, L. T. ; PETZL-ERLER, M. L. . HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Parana, Brazil. **Human Biology**, v. 72, p. 597-617, 2000.

PROBST, C. M. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1**. Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 1998.

RAMAN, K. G.; SAPPINGTON, P. L.; YANG, R.; LEVY, R. M.; PRINCE, J. M.; LIU, S.; WATKINS, S. K.; SCHMIDT, A. M.; BILLIAR, T. R.; FINK, M. P. The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal barrier dysfunction after hemorrhagic shock. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 291, p. G556-G565, 2006.

RISCH, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. **Nature**, v. 405, p. 847-856, 2000.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, p. 1516-1517, 1996.

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

RUDOFISKY, G. Jr.; ISERMANN, B.; SCHERKOFER, S.; ANDRASSY, M.; SCHNEIDER, J.G.; MORCOS, M.; HUMPERT, P.M.; SAYED, A.A.; WITTE, S.; RENN, W.; HAMANN, A.; NOSIKO, V.; SCHLEICHER, E.; HARING, H. U.; RUDOFISKY, G.; RITZ, E.; NAWROTH, P. P.; BIERHAUS, A. A 63 bp deletion in the promoter of *RAGE* correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 112, p. 135-141, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - a laboratory manual. 2<sup>a</sup>ed., **Cold spring Harbor Laboratory Press**, Plainview, 1989.

SANTOS, K. G.; CANANI, L. H.; GROSS, J. L.; TSCHIEDEL, B.; PIRES SOUTO, K. L.; ROISENBERG, I. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 85, p. 149-156, 2005.

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

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. RAGE: A new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p.368-375, 2000.

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

SCHMIDT, A. M.; HORI, O.; BRETT, J.; YAN, S. D.; WAUTIER, J. L.; STERN, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 14, p. 1521–1528, 1994.

SCHMIDT, A. M.; YAN, S. D.; BRETT, J.; MORA, R., NOWYGRAD, R.; STERN, D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 2155–2168, 1993.

SELKOE, D. J. Alzheimer's disease: a central role for amyloid. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 53, p. 438-447, 1994.

SELL, D. R.; MONNIER, V. M., Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 21597–21602, 1989.

SEO, P. G.; CHOI, W. W.; CHUNG, J. H. Pemphigus in Korea: clinical manifestations and treatment protocol. **Journal of Dermatology**, v. 11, p. 782–788, 2003.

SOULIS, T.; THALLAS, V.; YOUSSEF, S.; GILBERT, R. E.; MCWILLIAM, B. G.; MURRAY-MCINTOSH, R. P.; COOPER, M. E. Advanced glycation end products and their receptors co-localize in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. **Diabetologia**, v. 40, p. 619-628, 1997.

STAMM, S.; BEN-ARIB, S.; RAFALSKAA, I.; TANGA, Y.; ZHANGA, Z.; TOIBERB, D.; THANARAJC, T. A.; SOREQ, H. Function of alternative splicing. **Gene**, v. 344, p. 1 –20, 2005.

STERN, D.; YAN, S. D.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1615–1625, 2002.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**. 2 ed. São Paulo: Artmed, Editora, 2002.

SUGAYA, K.; FUKAGAWA, T.; MATSUMOTO, K.I.; MITA, K.; TAKAHASHI, E.O.I.; ANDO, A.; INOKO, H.; IKEMURA, T. Three genes in the human MHC class III region near junction with the class II: gene for receptor for advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a Notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics**, v. 23, p. 408–419, 1994.

TALLAB, T.; JOHARJI, H.; BAHAMDAN, K.; KARKASHAN E, MOURAD M, IBRAHIM K. The incidence of pemphigus in the southern region of Saudi Arabia. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 570–572, 2001.

TODD, J. A. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. **BioEssays**, v. 21, p. 164-174, 1999.

TORRES, M. C. Polimorfismo da região promotora e do exon 3 do gene *RAGE* (Receptor de Produtos de Glicação Avançada) em uma amostra da população Brasileira. **Monografia de conclusão de curso** em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2007.

TRÉMEAU-MARTINAGE, C.; OKSMAN, F.; BAZEX, J. Immunoglobulin G subclass distribution of anti-intercellular substance antibodies in pemphigus. **Annales de Dermatologie et de Venereologie**, v. 122, p. 409-11, 1995.

VANDERLUGHT, C. L.; MILLER, S. D. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implication for immunotherapy. **Nature Reviews**, v. 2, p. 85– 95, 2002.

VAN-LIERE, J. M.; ROSENBERG, N. A. Mathematical properties of the  $r^2$  measure of linkage disequilibrium. **Theoretical Population Biology**, v. 74, p. 130-137, 2008.

VELDMAN, C.; FELICIANI, C. Pemphigus: A Complex T Cell-dependent Autoimmune Disorder Leading to Acantholysis. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 3, p. 313-320, 2007.

VENABLES, J. P.; Downstream intronic splicing enhancers. **Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters**, v. 581, p. 4127-4131, 2007.

WARREN, S. J. P.; LIN, M. S.; GIUDICE, G. J.; HOFFMANN, R. G.; HANS-FILHO, G.; AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; SANTOS, V.; DIAZ, L. A. The prevalence of antibodies against desmoglein 1 in endemic pemphigus foliaceus in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, v. 43, p. 23-30, 2000.

WESTWOOD, M.E.; THORNALLEY, P.J. Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived

advanced glycation endproduct-modified serum albumins. **Journal of Protein Chemistry**, v. 14, p. 359–372, 1995.

WILLETT, W. C. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. **Science**, v. 296, p. 695-698, 2002.

WILSON, A. G.; CLAY, F. E.; CRANE, A. M.; CORK, M. J.; DUFF, G. W. Comparative genetic association of human leukocyte antigen class II and tumor necrosis factor-cc with dermatitis herpetiformis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.104, p. 856-858, 1995.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annal of Human Genetics**; v. 19, p. 251-253, 1955.

YAMAGISHI, S. HSU CC, TANIGUCHI M, HARADA S, YAMAMOTO Y, OHSAWA K, KOBAYASHI K, YAMAMOTO H. Receptor-mediated toxicity to pericytes of advanced glycosylation end products: a possible mechanism of pericyte loss in diabetic microangiopathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 213, p. 681–687, 1995.

YAN, S. D.; CHEN, X.; FU, J.; CHEN, M.; ZHU, H.; ROHER, A.; SLATTERY, T.; ZHAO, L.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; MIGHELI, A.; NAWROTH, P.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. **Nature**, v. 382, p. 674-5, 1996.

YONEKURA, H.; YAMAMOTO, Y.; SAKURAI, S.; PETROVA, R. G.; ABEDIN, M. D. 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. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 1097-109, 2003.

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

ZHOU, Z.; IMMEL, D.; XI, C. X.; BIERHAUS, A.; FENG, X.; MEI, L.; NAWROTH, P.; STERN, D. M.; XIONG, W. C. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1067-1080, 2006.

## ANEXOS

### ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

##### “ANÁLISE DE GENES DO MHC E OUTROS GENES DE FUNÇÃO RELACIONADA À RESPOSTA IMUNE, EM POPULAÇÕES”

Este é um convite para você participar voluntariamente do projeto de pesquisa ANÁLISE DE GENES DO MHC E OUTROS GENES DE FUNÇÃO RELACIONADA À RESPOSTA IMUNE, EM POPULAÇÕES. Por favor, leia com atenção as informações abaixo antes de dar ou não seu consentimento para participar deste estudo. Se houver qualquer dúvida sobre o estudo ou sobre este documento, pergunte ao pesquisador com quem você está conversando neste momento.

- OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo principal desse estudo é conhecer as variações normais de genes (formas alternativas de genes, denominadas *alelos*) e suas frequências, em populações humanas.

Por exemplo, para grupos sanguíneos, há 3 variações (alelos) principais: A, B e O. As combinações dessas resultam no grupo sanguíneo do indivíduo (combinações A/A ou A/O = grupo A; B/B ou B/O = grupo B; A/B = grupo AB; O/O = grupo O). As frequências de A, B e O diferem, entre populações. Por exemplo, nas populações indígenas das Américas o grupo sanguíneo B praticamente inexistente (quase 100% das pessoas pertencem ao tipo O), enquanto na Europa 35% das pessoas são do tipo B e, na África, 20%.

Enquanto a distribuição geográfica/étnica das variações do gene ABO são bem conhecidas, a diversidade populacional da maioria dos outros genes ainda é desconhecida. Nesse trabalho de pesquisa, vamos analisar 20 a 30 outros genes, em várias grupos da população brasileira.

O resultado será útil para conhecer as origens e as relações históricas das populações atuais e para compreender as causas da variabilidade humana normal.

- PROCEDIMENTOS

Se você participar deste estudo, será colhida uma amostra de seu sangue (10 até 20 ml, ou seja, correspondente a uma seringa pequena a média) e você irá responder a algumas perguntas sobre a sua origem geográfica e a origem de seus ancestrais, assim como sobre a sua saúde.

- RISCOS

Não há riscos previstos nesta etapa do estudo, sendo que o único desconforto poderá ser a retirada da amostra de sangue.

- BENEFÍCIOS

Não há nenhum benefício direto desta pesquisa para você, mas o conhecimento adquirido com este estudo poderá auxiliar na compreensão das causas da variabilidade genética normal da espécie humana. Isso poderá contribuir para a compreensão das funções dos genes estudados, assim como para a análise das relações históricas/biológicas entre as populações humanas.

- PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação neste estudo é *voluntária*. Mesmo que você decida participar, terá plena e total liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem que isso acarrete qualquer prejuízo para você. Embora não seja esperado, caso você tenha algum problema e não possa ir ao trabalho, você receberá um atestado médico para justificar a sua falta.

- ESCLARECIMENTO DE DÚVIDAS

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo.

- IDENTIFICAÇÃO

A sua identificação será mantida confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar a sua identidade.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler, UFPR

Diante do exposto acima eu, \_\_\_\_\_  
abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre os objetivos do presente estudo, sobre os desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que poderão resultar deste estudo. Concedo meu acordo de participação de livre e

espontânea vontade. Foi-me assegurado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar. Declaro também não possuir nenhum grau de dependência profissional ou educacional com os pesquisadores envolvidos nesse projeto (ou seja os pesquisadores desse projeto não podem me prejudicar de modo algum no trabalho ou nos estudos), não me sentindo pressionado de nenhum modo a participar dessa pesquisa.

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Voluntário (assinatura)

RG

---

Pesquisador (assinatura)

RG



## ANEXO II – FICHA DE AVERIGUAÇÃO

## PROJETO PÊNFIGO FOLIÁCEO

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	Nº DO PRONTUÁRIO	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

## 1) IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino

Estado civil: (1) solteiro(a) (4) divorciado(a)

(2) casado(a) (5) Outros: \_\_\_\_\_

(3) viúvo(a)

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_

UF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: ( \_\_ ) \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_ Próximo a: \_\_\_\_\_

Nome, telefone e endereço de pessoa para contato: \_\_\_\_\_

Municípios onde residiu:

MUNICÍPIO	TEMPO DE RESIDÊNCIA	EXPOSIÇÃO A (usar os códigos abaixo e especificar para cada exposição):	OBS

Código:

(1) Animais, (2) Insetos, (3) Rios, (4) Lavouras

Grupo étnico:

Pesquisador		Auto-classificação (conforme IBGE)
Lab	IBGE	
(1) Branco	(1) Branca	(1) Branca
(2) Mulato-claro	(2) Preta	(2) Preta
(3) Mulato-médio	(3) Amarela	(3) Amarela
(4) Mulato-escuro	(4) Parda	(4) Parda
(5) Negro	(5) Indígena	(5) Indígena
(6) Indígena		
(7) Oriental		
(8) Branco brasileiro		

História ocupacional

Emprego/Ocupação	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)	OBS

Escolaridade: \_\_\_\_\_ anos completos de estudo

Grau de instrução: \_\_\_\_\_ (1) Analfabeto \_\_\_\_\_ (5) Médio completo

- (2) Fundamental incompleto (6) Superior incompleto  
 (3) Fundamental completo (7) Superior completo  
 (4) Médio incompleto (8) Pós-graduação

Tipo de habitação: (1) madeira (2) alvenaria (3) mista (4) Outros: \_\_\_\_\_

Nº de cômodos: \_\_\_\_\_

Nº banheiros: \_\_\_\_\_

Saneamento básico: (1) Sim (2) Não

Energia elétrica: (1) Sim (2) Não

Nº de pessoas que vivem na habitação: \_\_\_\_\_

**2) HISTÓRIA FAMILIAR**

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Município de nascimento : \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5) Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Município de nascimento : \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Ascendência da mãe: (1) européia (2) africana (3) indígena (4) oriental (5)

Outros: \_\_\_\_\_

Cor de pele semelhante à sua? (1) Sim (2) Não (se não, descrever)

Quantas vezes engravidou / sua esposa engravidou? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram vivos? \_\_\_\_\_

Quantos filhos nasceram mortos? \_\_\_\_\_

Algum aborto (perca)? \_\_\_\_\_

Pais consangüíneos (considerar mesmo se primos distantes)? (1) Sim (2) Não (se sim, descrever com heredograma, no verso)

Número de irmãos - total: \_\_\_\_\_

Número de irmãos vivos: \_\_\_\_\_

Todos filhos dos mesmos pais? (1) Sim (2) Não

Ordem de nascimento dos irmãos:

---



---



---



---

Alguém na família tem a mesma doença? (1) Sim (2) Não

Caso haja algum caso, fazer o heredograma dos familiares (no verso)

A doença foi semelhante à sua? (1) Sim (2) Não

Caso não seja semelhante, especificar abaixo a diferença:

---



---



---

<b>PROJETO PÊNFIGO FOLIÁCEO</b>			
<b>CÓDIGO DO INDIVÍDUO</b>	<b>Nº DO PRONTUÁRIO</b>	<b>DATA DA AVERIGUAÇÃO</b>	<b>AVERIGUADOR</b>
[ ]	[ ]	[ ]	[ ]

Nome: \_\_\_\_\_

### 3) ASPECTOS CLÍNICOS

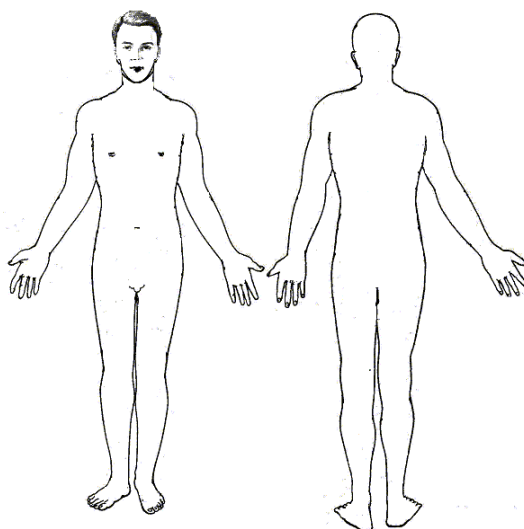
#### LESÃO PRIMÁRIA

Município em que apareceu: \_\_\_\_\_ Idade:

\_\_\_\_\_ Ano: \_\_\_\_\_

Mês do ano em que apareceu: \_\_\_\_\_

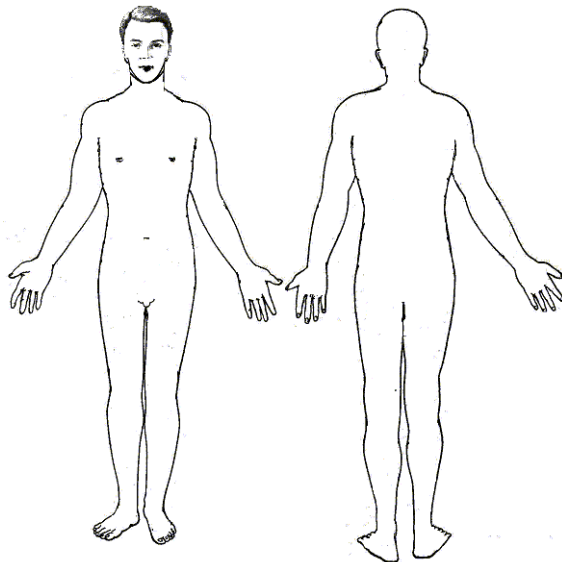
Região do corpo:



## EVOLUÇÃO DAS LESÕES

A lesão se disseminou? (1) Sim (2) Não

Caso tenha se disseminado, utilize o esquema abaixo para mostrar a evolução em ordem crescente (ex: 1 marca o primeiro lugar em que surgiram novas lesões, 2 o



segundo e assim sucessivamente. Utilizar a mesma chave numérica na tabela abaixo.

[LOCAL (usar número colocado no esquema acima)	TEMPO APÓS LESÃO PRIMÁRIA

### DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Base do diagnóstico: (1) Informações clínicas    (2) Histopatológico    (3) Imunohistoquímica

Local do diagnóstico:

Instituição: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_

Informações adicionais sobre diagnóstico:

(1) Informações clínicas: \_\_\_\_\_

(2) Histopatológico: \_\_\_\_\_

(3) Imunohistoquímica: \_\_\_\_\_

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS**

ANTICORPO	DATA	TÍTULO

**TRATAMENTO ATUAL**

Medicamento : \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_

Posologia: \_\_\_\_\_

Data de início: \_\_\_\_\_

Melhora das lesões: (1) Sim (2) Não

**TRATAMENTOS ANTERIORES**

MEDICAMENT O	DOS E	VIA DE ADMINISTRAÇÃ O (usar código abaixo)	POSOLOGI A	INÍCIO (mês/an o)	FIM (mês/an o)	Melhor a das lesões ? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

Houve interrupção do tratamento? (1) Sim (2) Não

Se houve interrupção, especificar:

Tempo: \_\_\_\_\_ (meses)

Motivo: \_\_\_\_\_

**OUTROS MEDICAMENTOS**

MEDICAMENTO	DOSAGEM	VIA DE ADMINISTRAÇÃO (usar código abaixo)	POSOLOGIA	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Melhora das lesões? (1) Sim (2) Não

Código: (1) tópico; (2) via oral; (3) via intravenosa

**OUTRAS DOENÇAS:**

DOENÇA	DATA DE DIAGNÓSTICO	DATA DE CURA	TRATAMENTO

**HÁBITOS ALIMENTARES**

Costuma ingerir (marcar todos que se aplica):

Alimento	Freqüência	Quantidade	OBS
(1) manga			
(2) alho			
(3) alho-poró			
(4) cebola			
(5) água de poço/rio			

**EXPOSIÇÃO A AGENTES QUÍMICOS** (considerar: agrotóxicos, tintas, solventes...)

AGENTE	INÍCIO (mês/ano)	FIM (mês/ano)	Freqüência (vezes por semana)	OBS

## ANEXO III – PRECIPITAÇÃO DE DNA EM ACETATO DE AMÔNIO

### PROTOCOLO DE PRECIPITAÇÃO DE DNA – ACETATO DE AMÔNIO

Obs.: protocolo para cada 10 uL de amostra de DNA.

1. Adicionar 7 uL de acetato de amônio 7,5 M e homogeneizar (spin na centrífuga);
2. Adicionar 34 uL (2 Volumes do total da solução anterior) de etanol absoluto (ou 95%), homogeneizar e observar a formação de um precipitado (preferencialmente);
3. Misturar bem em vortex (baixa rotação) e inverter até observar o precipitado (preferencialmente), deixar alguns minutos na bancada (ou no gelo se for pouco DNA);
4. Centrifugar por 15 min;
5. Imediatamente após a centrifugação, descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet;
6. Lavar o pellet com etanol 70% (200 uL para tubos de 600 ul);
7. Centrifugar por 15 min;
8. Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet;
9. Secar no vácuo ou na bancada;
10. Dissolver o pellet em Tris 10 mmol/L + EDTA 0,1 mmol/L: a quantidade necessária dependendo da concentração inicial da amostra.

ANEXO IV – RFLP PARA GENOTIPAGEM DO SNP -374 T>A DE *RAGE*

CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO PARA O PRODUTO DE PCR DA REGIÃO PROMOTORA COM A ENZIMA Tsp509I.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO NA REAÇÃO	VOLUME (µL)
Produto de PCR	≈2,4 ng/µL	1,25
NEBuffer 1 (10x)	1x	0,5
Tsp509I (10 U/µL)	0,25 U/µL	0,125
Água Reagente Tipo 1 estéril	q.s.p. 10 µL	3,125
Volume final		5,0
Homogeneizar e deixar em banho-maria a 65°C por 16 horas		

Tampão NEBuffer 1 [10X] (New England Biolabs): 100 mmol Bis-Tris propano-HCl; 100 mmol MgCl<sub>2</sub>; 10 mmol ditioneitol, pH 7,0 a 25°C. q.s.p.: quantidade suficiente para.

Os produtos de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (20:1 ou 29:1) em tampão TBE 1x (item 4.3.1) a 4°C (Sistema Mini Protean<sup>®</sup> 3 Cell, Bio-Rad). As eletroforeses foram realizadas com 5 µL (~ 12 ng) do produto de restrição misturado a 5 µL de solução de aplicação (item 4.3.1), em voltagem constante de 100 V, ~15 mA, por cerca de duas horas. Após a corrida eletroforética o DNA foi corado em brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (302nm). As imagens foram capturadas Sistema Biochemi, UVP e foram armazenadas em computador além de impressas.